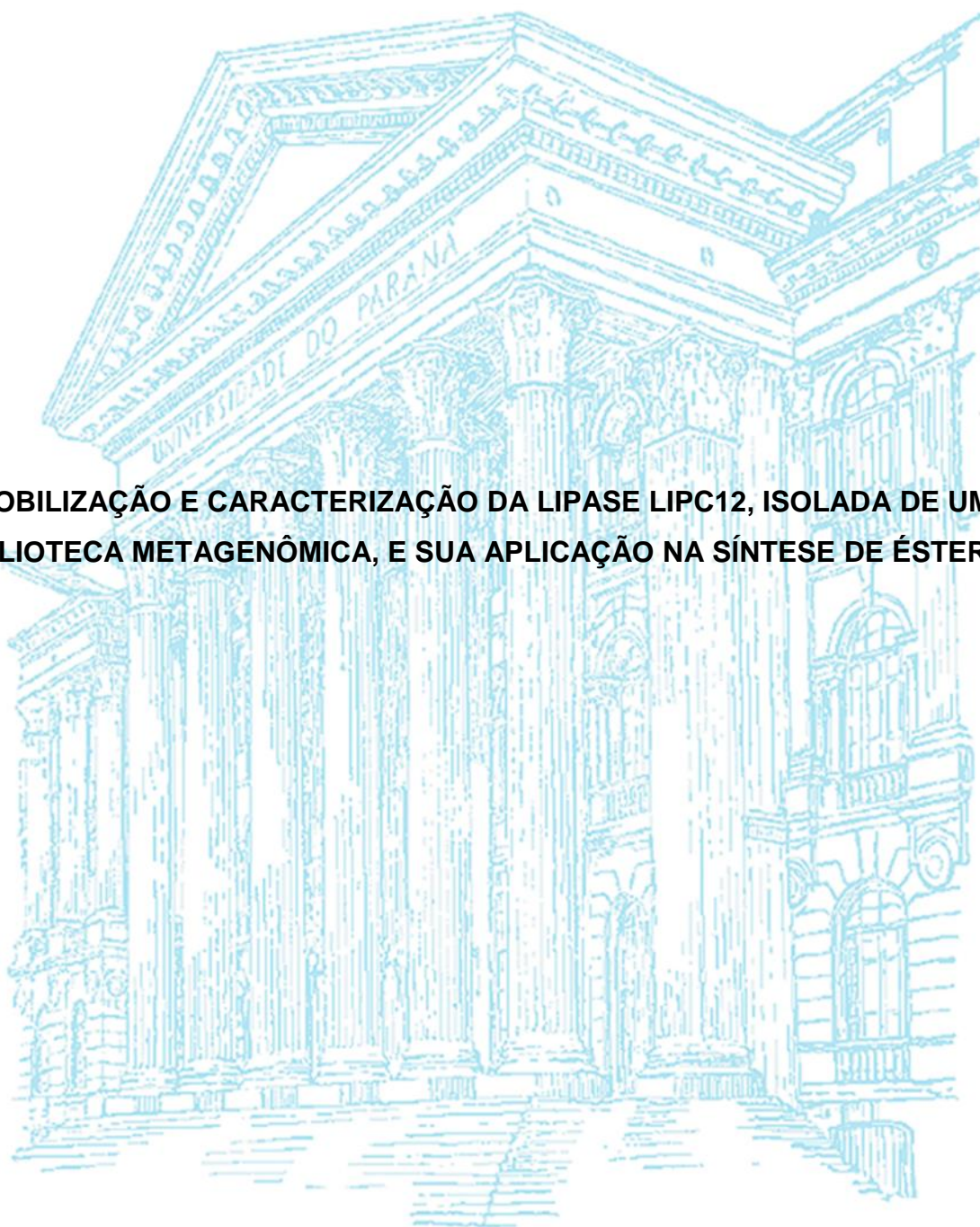


ALINE DUTRA MADALOZZO

**IMOBILIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA LIPASE LIPC12, ISOLADA DE UMA
BIBLIOTECA METAGENÔMICA, E SUA APLICAÇÃO NA SÍNTESE DE ÉSTERES**



CURITIBA

2015

ALINE DUTRA MADALOZZO

**IMOBILIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA LIPASE LIPC12, ISOLADA DE UMA
BIBLIOTECA METAGENÔMICA, E SUA APLICAÇÃO NA SÍNTESE DE ÉSTERES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

Orientadora: Prof. Dra. Nadia Krieger

Co-orientadora: Prof. Dra. Gisella Maria Zanin

CURITIBA


2015

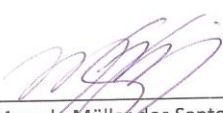
TERMO DE APROVAÇÃO


ALINE DUTRA MADALOZZO

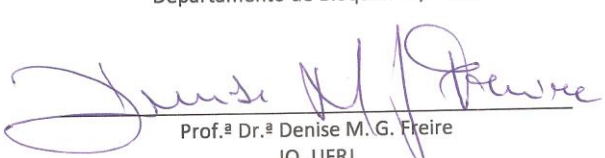
IMOBILIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA LIPASE LIPC12, ISOLADA DE UMA BIBLIOTECA METAGENÔMICA E SUA APLICAÇÃO NA SÍNTESE DE ÉSTERES

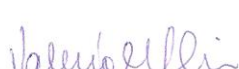
Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:


Prof.ª Dr.ª Nadia Krieger - Orientadora
Departamento de Bioquímica, UFPR


Prof. Dr. Marcelo Müller dos Santos
Departamento de Bioquímica, UFPR


Prof. Dr. Emanuel M. de Souza
Departamento de Bioquímica, UFPR


Prof.ª Dr.ª Denise M. G. Freire
IQ, UFRJ


Prof.ª Dr.ª Valéria M. G. do Nascimento
Departamento de Ciências Biológicas, UNESP

Curitiba, 04 de maio de 2015.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora professora Nadia Krieger pela orientação, por todo o conhecimento transmitido e por confiar mais uma vez em mim me dando a oportunidade de realização deste doutorado nesta linha de pesquisa.

À minha co-orientadora professora Gisela Zanin pela oportunidade de desenvolver parte deste trabalho no Laboratório de Tecnologia Enzimática do Departamento de Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá, e pelo aceite em ser minha co-orientadora.

Ao professor David Mitchell pela atenção, paciência e valiosas colaborações neste trabalho através da escrita e correção dos artigos.

Aos professores da banca interna, Marcelo Müller-Santos e Emanuel Maltempi de Souza, pelas valiosas sugestões e correções ao longo de todo o desenvolvimento deste trabalho.

Aos membros da banca externa, Prof^a. Denise Freire e Prof^a. Valéria Gomes do Nascimento pelo aceite em contribuir para o aperfeiçoamento desta tese.

Ao professor Miguel Nosedá, professora Sílvia Cadena e professora Gláucia Martinez, coordenadores do curso de pós-graduação em Bioquímica, pela paciência, compreensão e dedicação ao Programa de Pós-graduação.

Aos secretários do curso de pós-graduação em Bioquímica Sra. Irene e Thiago Velo, que sempre foram atenciosos em todas as solicitações.

Ao professores e alunos do Núcleo de Fixação de Nitrogênio por permitir a utilização de equipamentos e laboratórios durante parte do desenvolvimento deste trabalho.

Ao Valter Antônio de Baura e Roseli Prado pelo auxílio técnico nas etapas de expressão e purificação das proteínas, além das inúmeras contribuições que prestam nos trabalhos desenvolvidos no Núcleo de Fixação de Nitrogênio – Bioquímica.

Aos professores e alunos do Laboratório de Tecnologia Enzimática do Departamento de Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá por permitir a utilização de equipamentos e laboratórios durante o desenvolvimento de parte deste trabalho. Aos técnicos Lauro M. Kambara e Luisa P. V. Calsavara, deste mesmo departamento, pelo auxílio e dedicação com todos os alunos.

Ao meu querido esposo Rafael que apesar da distância sempre esteve do meu lado me dando todo o apoio e incentivo, pelo orgulho em me ver realizar mais uma etapa tão importante na minha vida. Obrigada por todo teu amor.

Aos meus amados pais Adalberto e Ana Maria (*in memoriam*) pelo amor, educação e formação, vocês são exemplos de motivação e determinação que me fizeram chegar até aqui.

Aos meus queridos irmãos Adriana, Egberto e Gisele simplesmente por existirem em minha vida e que apesar da distância estão sempre presentes me dando apoio em tudo que eu faço. Obrigada por me darem sobrinhos tão maravilhosos Gui, João, Ana Maria e Joaquim, que fizeram destes anos muito mais leves e alegres.

À minha cunhada e amiga maravilhosa Ana Paula (Anita) que sempre compartilhou comigo as aflições e comemorou as vitórias durante esta jornada.

Às minhas amigas mais que especiais Lilli, Dani e Pês que fizeram parte da minha infância e formação. Obrigada por continuarem fazendo parte da minha vida mesmo a longas distâncias (Lilli e Dani) e à Pesinha por estar por perto sempre compartilhando TODOS os momentos desta jornada, obrigada por tudo amiga.

Às colegas e amigas do mestrado e doutorado Tati, Fran, Elaine e Sarah pela amizade, pelas conversas, desabafos, saídas e momentos de descontração durante estes 6 anos.

Aos colegas e amigos do LTEB e NPDEAS Christiane, Kátia, Viviane, Rodrigo, Edgar, Diniara, Alessandra, Cassiana, Wellington, Mirian, Maritza, Vanderléia, Allen, Robson, Daniele, Aline Pereira, Débora, Laís, Michelle, Jonas, Fernanda, Glauco, Maura, Jonathan, Luana, Maribel, Anelize, Andrei, Giovana, Fernanda Marchesini, Francine, Lucas, Nicoli, Alexandre, Diogo, Leonardo, Rafael, Edmilson, Thamiris e Thalita. Em especial, à Viviane Paula Martini por todo seu conhecimento e ensinamentos transmitidos com muita paciência no início desta etapa, e pelo grande comprometimento com este trabalho. Obrigada principalmente pela amizade, amparo e longas conversas na Dona Maria; à aluna de iniciação científica Keyla Kaori Kunioshi pela amizade, troca de conhecimentos e por contribuir com muita dedicação nos experimentos realizados neste trabalho; à Diniara Soares pelos ensinamentos no cromatógrafo de fase gasosa, mas principalmente pela amizade, conversas e apoio em momentos difíceis, mas com muitos momentos de alegria compartilhados; à Katia Raserá pela paciência e dedicação em transmitir seu conhecimento sobre os métodos de análise de lipídios estruturados; à Mirian, que se tornou uma amiga muito querida,

obrigada pelas longas conversas, amparo e o carinho, e por estar sempre orando e torcendo por mim; à Vanda pela parceria e amizade todos estes anos, sempre pronta para ajudar, obrigada por todas suas contribuições neste trabalho e no laboratório, tornando-o um ambiente de trabalho mais organizado e alegre; ao Jonas e à Maritza pela amizade, longas conversas e discussões “sempre” sobre assuntos de pesquisa (é claro), juntamente com a Vanda, Dini, Mirian, Débora e Laís, e geralmente apreciando um bom café; ao Glauco pelas vezes que me ajudou no GC e pela parceria nas horas e horas de escrita. Enfim, cada um tem uma participação especial no decorrer deste trabalho, com discussões, conselhos, ensinamentos, troca de idéias e com certeza todos serão sempre lembrados com muito carinho.

Às minhas colegas de moradia temporária Mara, Ana, Aline, Sol e Fran, obrigada por me receberem tão bem, em especial à Mara que dividiu seu espaço comigo, mesmo que por pouco tempo, foi de grande valia.

Às “Marias”, ou seja, colegas e amigas moradoras da pensão da Dona Maria Viviane, Vanda, Allen, Dilamara, Edione, Fernanda, Jaqueline, Priscila, Tatiane, Vanessa e Gislaine, pelos momentos de convivência e pela amizade. E à Dona Maria por toda sua dedicação e carinho com todas.

Às minhas colegas e novas amigas Camila Braga e Janaína do Laboratório de Tecnologia Enzimática da UEM, obrigada pelo carinho com que me receberam, pelas conversas nos intervalos de alíquotas e a amizade que quero levar para sempre.

À UFPR e à Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, pela oportunidade em fazer parte de um dos melhores programas de pós-graduação do Brasil.

Ao CNPQ pelo auxílio financeiro.

A todos que fizeram parte ou que de alguma forma me ajudaram na realização deste doutorado, e à Deus pela vida e por me dar saúde para alcançar meus objetivos.

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que limitar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota”.

Theodore Roosevelt

RESUMO

Neste trabalho, uma nova lipase isolada de uma biblioteca metagenômica, LipC12, foi imobilizada e sua aplicação na síntese de ésteres foi estudada. Inicialmente, LipC12, que contém uma cauda composta de 6 histidinas (cauda His) em sua estrutura, foi purificada em coluna de níquel e imobilizada por adsorção em polipropileno em pó (Accurel MP-1000) e em sílica em pó (Celite 545), e por ligação covalente em um copolímero acrílico (Immobead 150) e em uma membrana de polipropileno funcionalizada com glutaraldeído. Preparações com cargas de proteína de 10 mg g⁻¹ (proteína/suporte) foram utilizadas na síntese do oleato de etila em *n*-hexano, utilizando etanol e ácido oleico numa razão molar (RM) de 3:1. LipC12 imobilizada no Immobead 150 proporcionou uma maior conversão em éster (95% em 4 h). Isto levou à investigação da imobilização de LipC12 diretamente do extrato bruto (EB) no Accurel MP-1000 e Immobead 150. No entanto, Accurel MP-1000 não proporcionou imobilização seletiva de LipC12, sendo a eficiência de imobilização (E) muito baixa (29%), provavelmente devido à imobilização de outras proteínas do EB no suporte. Estudos de saturação do suporte Immobead revelaram que, com carga de proteína de 200 mg g⁻¹ de suporte, o preparado imobilizado (lbead-EBLipC12) utilizado na síntese do oleato de etila em *n*-hexano (RM 3:1, 40 °C, 250 rpm) proporcionou conversão em éster de 99% em 60 min. lbead-EBLipC12 foi reutilizada em 10 ciclos sucessivos de 60 min na mesma reação, obtendo-se conversões acima de 90%. Em seguida, lbead-EBLipC12 foi utilizada para catalisar reações em sistemas livres de solvente, e na síntese do oleato de etila com RM de 1:1, uma reação modelo para a síntese de ésteres do biodiesel, obteve-se uma conversão de aproximadamente 30%, mas toda a atividade foi perdida em 12 h. No entanto, quando a reação foi repetida com a adição do etanol em seis alíquotas iguais durante a reação, foi encontrada uma conversão em éster de 85% em 48 h. Por outro lado, na síntese do caprilato de etila, um éster de aroma, a conversão foi de apenas 6% após 96 h, mesmo com a adição do etanol em etapas. Na reação de síntese de um lipídio estruturado, utilizando ácido caprílico e azeite de oliva (RM 2:1, 40 °C, 250 rpm) lbead-LipC12 promoveu a inserção de 23% de ácido caprílico nas posições *sn*-1 e *sn*-3 dos triacilgliceróis do azeite de oliva, tornando-o um lipídio estruturado do tipo MLM (ácidos graxos de cadeia média nas posições *sn*-1,3 e ácido graxo de cadeia longa na posição *sn*-2). Estes resultados mostram que lbead-EBLipC12 tem um bom potencial para ser utilizada na síntese enzimática de biodiesel e de lipídios estruturados. Além disso, a possibilidade de imobilizar LipC12 diretamente a partir do extrato bruto de proteínas, evita a necessidade de purificá-la antes da imobilização.

Palavras-chave: metagenômica, lipases, LipC12, imobilização, síntese de ésteres, biodiesel, lipídeos estruturados, aromas.

ABSTRACT

In this work, a new metagenomic lipase, LipC12, was immobilized and its characterization and application in the synthesis of esters was studied. Initially, LipC12, which contains a histidine tag (His-tag) in its structure, was purified on a nickel column and immobilized by adsorption on the supports Accurel MP-1000 and Celite 545, and by covalent bonding on Immobead 150 and on a functionalized polypropylene membrane. Preparations obtained with 10 mg of protein per gram of support were compared with respect to the synthesis of ethyl-oleate in *n*-hexane, using an ethanol to oleic acid molar ratio of 3:1. LipC12 gave a better conversion of oleic acid when immobilized on Immobead 150 (95% in 4 h). This led us to investigate the immobilization of His-tagged LipC12 directly from the crude extract on Immobead 150 and Accurel MP-1000. However, Accurel MP-1000 did not provide selective immobilization of LipC12, and probably due to immobilization of other proteins of the EB in support, the immobilization efficiency (E) was too low. At a protein loading of 200 mg g⁻¹, the immobilized preparation ("Ibead-CELipC12") gave a conversion of oleic acid of 99% in 60 min, for reactions performed in *n*-hexane (molar ratio 3:1, 40 °C, 250 rpm) and could be reused in successive cycles of 60 min in the same reaction to give conversions above 90%. When Ibead-CELipC12 was used to catalyze the esterification of oleic acid with ethanol in a solvent-free system (standard reaction for the synthesis of esters biodiesel) at an ethanol to oleic acid molar ratio of 1:1, all activity was lost within 12 h, with a conversion of oleic acid of around 30%. However, when the reaction was repeated with the addition of ethanol in six equal aliquots during the course of the reaction, a conversion of oleic acid of 85% in 48 h was achieved. Moreover, in the synthesis of ethyl caprylate, an aroma ester, the conversion was only 6% after 96 h, even with the addition of ethanol in aliquots. In the synthesis of a structured lipid, using caprylic acid and olive oil (molar ratio 2:1, 40 °C, 250 rpm), Ibead-CELipC12 promoted the insertion of 23% of caprylic acid in the *sn*-1 and *sn*-3 positions of the triacylglycerols of the olive oil, making it a structured lipid MLM, i.e a triacylglycerol containing medium-chain fatty acids (M) at positions *sn*-1 and *sn*-3 and a long-chain fatty acid (L) at position *sn*-2. These results demonstrate that LipC12 has good potential to be used in the enzymatic synthesis of biodiesel and structured lipids. The results are particularly encouraging because it was possible to immobilize His-tagged LipC12 directly from the crude extract, thereby avoiding the need to purify the enzyme prior to immobilization.

Keywords: metagenomic, lipases, LipC12, immobilization, ester synthesis, biodiesel, structured lipids, aroma.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - REAÇÃO DE HIDRÓLISE CATALISADA POR LIPASES	22
FIGURA 2 - REAÇÕES DE SÍNTESE CATALISADAS POR LIPASES.....	24
FIGURA 3 - TÉCNICA DE METAGENÔMICA PARA ISOLAMENTO DE ENZIMAS E BIOCOMPOSTOS.....	26
FIGURA 4 - NÚMERO DE PUBLICAÇÕES EM METAGENÔMICA NOS ÚLTIMOS 15 ANOS	27
FIGURA 5 - A - ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DE LipC12, B - TRIÁDE CATALÍTICA DE LipC12, RESÍDUOS Ser ⁸³ , Asp ²³⁸ e His ²⁶⁰ SOBREPOSTA À DA LIPASE DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PAL). Cor verde para LipC12 e cor azul para PAL (Ser ⁸² , Asp ²²⁹ e His ²⁵¹).....	33
FIGURA 6 - PRINCIPAIS MÉTODOS PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES	35
FIGURA 7 - FOTOMICROGRAFIA DO SUPORTE ACCUREL MP-1000	37
FIGURA 8 - REPRESENTAÇÃO DA IMOBILIZAÇÃO DE UMA PROTEÍNA NO SUPORTE CONTENDO GRUPOS EPÓXIDO ATIVADO COM ÍONS Co ²⁺ ATRAVÉS DA ADSORÇÃO SELETIVA E LIGAÇÃO COVALENTE	40
FIGURA 9 - (a) ENANTIÔMERO DE REAÇÃO MAIS RÁPIDA, (b) ENANTIÔMERO DE REAÇÃO MAIS LENTA NO MODELO SÍTIO ATIVO PARA LIPASES DERIVADO DA REGRA DE KAZLAUSKAS et al. (1991)	48
FIGURA 10 - SÍNTESE DE ÉSTERES DO BIODIESEL	51
FIGURA 11 - FLUXOGRAMA DA ESTRATÉGIA DE TRABALHO	58
FIGURA 12 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DE LIPC12 EM ACCUREL MP-1000.....	62
FIGURA 13 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA FUNCIONALIZAÇÃO E ATIVAÇÃO DA MEMBRANA DE POLIPROPILENO E IMOBILIZAÇÃO DE LIPC12	64
FIGURA 14 - REPRESENTAÇÃO DO MÉTODO DE IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES NO SUPORTE IMMOBEAD 150.....	65
FIGURA 15 - PLACA DE CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA IDENTIFICANDO A BANDA CORRESPONDENTE AO TRIACILGLICEROL APÓS ETAPAS DE EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS, MONOACILGLICERÓIS E DIACILGLICERÓIS	83
FIGURA 16 - ELETROFORESE SDS-PAGE DO TESTE DE EXPRESSÃO DA LIPASE LIPC12	87
FIGURA 17 - ELETROFORESE SDS-PAGE DAS FRAÇÕES RESULTANTES DA PURIFICAÇÃO DA LIPASE LIPC12 POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE EM COLUNA DE NÍQUEL	87
FIGURA 18 - ESTABILIDADE DA LIPASE LIPC12 PURIFICADA DURANTE O ARMAZENAMENTO A 4 °C	90
FIGURA 19 - CINÉTICA DE IMOBILIZAÇÃO DE LIPC12 EM ACCUREL MP-1000 EM TERMOS DE ATIVIDADE RESIDUAL DO SOBRENADANTE	91

FIGURA 20 - SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA CATALISADA POR LIPC12 IMOBILIZADA EM ACCUREL MP-1000.....	94
FIGURA 21 - CINÉTICA DE IMOBILIZAÇÃO DE LIPC12 EM MEMBRANA DE POLIPROPILENO ATIVADA COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GLUTARALDEÍDO.....	96
FIGURA 22 - SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA CATALISADA POR LIPC12 IMOBILIZADA EM IMMOBEAD 150.....	100
FIGURA 23 - ESTABILIDADE DE LIPC12 IMOBILIZADA EM ACCUREL MP-1000 E IMMOBEAD 150 FRENTE A VÁRIOS CICLOS DE REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO	102
FIGURA 24 - CINÉTICA DE IMOBILIZAÇÃO DE LIPC12 EM ACCUREL MP-1000 A PARTIR DO EXTRATO BRUTO	103
FIGURA 25 - CINÉTICA DE IMOBILIZAÇÃO DE LIPC12 A PARTIR DO EXTRATO BRUTO EM ACCUREL MP-1000 COM DIFERENTES CARGAS DE PROTEÍNA..	105
FIGURA 26 - SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA CATALISADA POR ACC-EBLIPC12	107
FIGURA 27 - IMOBILIZAÇÃO DE LIPC12 NO IMMOBEAD 150 ATIVADO E NÃO ATIVADO COM Cu^{2+} A PARTIR DO EXTRATO BRUTO.....	108
FIGURA 28 - SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA CATALISADA POR IBEADCu ²⁺ -EBLIPC12 E IBEAD-EBLIPC12.....	109
FIGURA 29 - ESTABILIDADE DE IBEAD-EBLIPC12 FRENTE A VÁRIOS CICLOS DE REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO	112
FIGURA 30 - CONVERSÃO EM ÉSTER NA REAÇÃO DE SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA CATALISADA POR LIPC12 IMOBILIZADA EM IMMOBEAD 150 A PARTIR DO EXTRATO BRUTO SOB DIFERENTES CONDIÇÕES	118
FIGURA 31 - EFEITO DA QUANTIDADE DE IBEAD-EBLIPC12 (A) TEMPERATURA (B) E AGITAÇÃO (C) NA SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA.....	121
FIGURA 32 - ESTABILIDADE DE IBEAD-EBLIPC12 DURANTE ARMAZENAMENTO A -18 °C.....	122
FIGURA 33 - ESTABILIDADE DE IBEAD-EBLIPC12 EM DIFERENTES TEMPERATURAS.....	126
FIGURA 34 - AVALIAÇÃO DA REGIOSSELETIVIDADE DE IBEAD-EBLIPC12	127
FIGURA 35 - ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO DE IBEAD-EBLIPC12 FRENTE A ÁCIDOS GRAXOS DE DIFERENTES TAMANHOS DE CADEIA E GRAUS DE SATURAÇÃO.....	128
FIGURA 36 - ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO DE IBEAD-EBLIPC12 FRENTE A ALCOÓIS DE DIFERENTES TAMANHOS DE CADEIA	130
FIGURA 37 - SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE CATALISADA POR IBEAD-EBLIPC12.....	132
FIGURA 38 - SÍNTESE DO CAPRILATO DE ETILA EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE CATALISADA POR IBEAD-EBLIPC12.....	135

FIGURA 39 - PLACA DE CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA IDENTIFICANDO AS BANDAS CORRESPONDENTES AO PRODUTO DA HIDRÓLISE DO LIPÍDIO ESTRUTURADO.....137

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DA LIPASE LIPC12	28
TABELA 2 – ESTUDOS RECENTES SOBRE A OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LIPASES DE METAGENÔMICA (CONTINUA)	30
TABELA 3 - VALORES DE LOG P DE ALGUNS SOLVENTES ORGÂNICOS	44
TABELA 4 - SUPORTES UTILIZADOS PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPC12 E SUAS PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS	60
TABELA 5 - TABELA DE PURIFICAÇÃO DE LIPC12	88
TABELA 6 - ATIVIDADE DE HIDRÓLISE EM MEIO AQUOSO E EM MEIO ORGÂNICO DE DIFERENTES PREPARAÇÕES DA LIPASE LIPC12.....	89
TABELA 7 – CARACTERIZAÇÃO DE LIPC12 IMOBILIZADA EM ACCUREL MP-1000 COM DIFERENTES CARGAS DE PROTEÍNA	92
TABELA 8 - CARACTERIZAÇÃO DE LIPC12 IMOBILIZADA EM MEMBRANA DE POLIPROPILENO ATIVADA COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GLUTARALDEÍDO	97
TABELA 9 - CARACTERIZAÇÃO DE LIPC12 IMOBILIZADA EM DIFERENTES SUPORTES.....	98
TABELA 10 - CARACTERIZAÇÃO DE LIPC12 IMOBILIZADA EM ACCUREL MP-1000 A PARTIR DO EXTRATO BRUTO (ACC-EBLIPC12)	104
TABELA 11 - CARACTERIZAÇÃO DE ACC-EBLIPC12 COM DIFERENTES CARGAS DE PROTEÍNA	106
TABELA 12 - EFEITO DA CARGA DE PROTEÍNA NA EFICIÊNCIA DE IMOBILIZAÇÃO E NA ATIVIDADE DE LIPC12 IMOBILIZADA NO IMMOBEAD 150 A PARTIR DO EXTRATO BRUTO	111
TABELA 13 - REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO CATALISADAS POR LIPASES ..	113
TABELA 14 - IMOBILIZAÇÃO DE LIPC12 EM IMMOBEAD 150 A PARTIR DO EXTRATO BRUTO SOB DIFERENTES CONDIÇÕES	116
TABELA 15 - ESTABILIDADE DE IBEAD-EBLIPC12 EM SOLVENTES ORGÂNICOS	124
TABELA 16 - COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GRAXOS DO AZEITE DE OLIVA ANTES E DEPOIS DA REAÇÃO DE ACIDÓLISE CATALISADA POR IBEAD-EBLIPC12..	136

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Acc-LipC12	LipC12 purificada imobilizada em Accurel MP-1000
Acc-EBLipC12	LipC12 imobilizada em Accurel MP-1000 a partir do extrato bruto
AOCS	<i>American Oil Chemist's society</i>
At _i	Atividade enzimática inicial
At _f	Atividade enzimática final
A _o	Atividade de hidrólise determinada em meio orgânico
A _T	Atividade teórica determinada em meio orgânico
AGL	Ácido graxo livre
BCA	Ácido bicinchonínico
BSA	Albumina sérica bovina
CALB	Lipase B de <i>Candida antarctica</i>
CCD	Cromatografia de camada delgada
Cel-LipC12	LipC12 purificada imobilizada em Celite 545
CG	Cromatógrafo gasoso
CLA	Ácido linoleico conjugado
CLEAs	<i>Cross-linked enzyme aggregates</i>
DO ₆₀₀	Densidade óptica (λ = 600 nm)
E	Eficência de imobilização
EB	Extrato bruto
EBLipC12	Extrato bruto de LipC12
His	Histidina
Ibead	Immobead
IbeadCu ²⁺	Immobead ativado com íons cobre II
Ibead-LipC12	LipC12 purificada imobilizada em Immobead 150
Ibead-EBLipC12	LipC12 imobilizada em Immobead 150 a partir do extrato bruto
IDA	Ácido iminodiacético
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
LB	Meio de cultivo Lúria Bertani
Log <i>P</i>	Logaritmo do coeficiente de partição do octanol em água
LTEB	Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise

MLM	Triaciglicerol contendo ácidos graxos de cadeia média nas posições <i>sn</i> -1 e <i>sn</i> -3 e um ácido graxo de cadeia longa na posição <i>sn</i> -2
MP-LipC12	LipC12 purificada imobilizada em membrana de polipropileno
NPDEAS	Núcleo Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Auto Sustentável
<i>p</i> NPP	Palmitato de <i>p</i> -nitrofenila
PP	Polipropileno
R	Retenção de atividade
R _{O/A}	Razão entre as atividades em meio orgânico e aquoso
ROL	Lipase de <i>Rhizopus oryzae</i>
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecilsulfato de sódio
U	Unidades de atividade enzimática ($\mu\text{mol min}^{-1}$)
U mg ⁻¹	Unidades de atividade enzimática por miligrama de proteína
U g ⁻¹	Unidade de atividade enzimática por grama de suporte

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
3.1 LIPASES	22
3.1.1 Definição e características	22
3.1.2 Fontes de lipases	25
3.1.3 Prospecção de lipases em bibliotecas metagenômicas	25
3.1.4 A lipase LipC12	27
3.2 IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES COMO UMA ALTERNATIVA PARA MELHORAR A ATIVIDADE E A ESTABILIDADE ENZIMÁTICA	34
3.2.1 Principais métodos de imobilização de lipases	35
3.2.1.1 Adsorção	35
3.2.1.2 Ligação covalente	38
3.2.2 Imobilização de enzimas portadoras de cauda de histidina	39
3.2.3 Efeito da imobilização sobre a atividade e especificidade da enzima.....	41
3.3 APLICAÇÃO DE LIPASES EM BIOCATÁLISE	43
3.3.1 Características importantes para aplicação de lipases em biocatálise.....	43
3.3.1.1 Estabilidade em solventes orgânicos	43
3.3.1.2 Estabilidade e atividade em diferentes temperaturas.....	45
3.3.1.3 Regiosseletividade, tiposseletividade e enantioseletividade.....	46
3.3.2 Sistemas reacionais utilizados em biocatálise com lipases.....	49
3.3.3 Aplicações de lipases na síntese de ésteres.....	50
3.3.3.1 Ésteres do biodiesel	51
3.3.3.2 Ésteres de aromas	53
3.3.3.3 Lipídios estruturados	55
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	58
4.1 ESTUDOS DE IMOBILIZAÇÃO DE LIPC12 PURIFICADA	59
4.1.1 Superexpressão e purificação	59
4.1.2 Seleção dos suportes para a imobilização	60
4.1.3 Procedimentos para imobilização.....	61

4.1.3.1 Accurel MP-1000	61
4.1.3.2 Celite 545	62
4.1.3.3 Membrana de polipropileno ativada com glutaraldeído	62
4.1.3.4 Immobead 150	64
4.1.4 Cinética de imobilização	65
4.2 IMOBILIZAÇÃO DE LIPC12 A PARTIR DO EXTRATO BRUTO	66
4.2.1 Imobilização em Accurel MP-1000	67
4.2.2 Imobilização em Immobead 150	67
4.2.2.1 Efeito de diferentes condições (pH e tempo de incubação) na imobilização de LipC12 em Immobead 150 a partir do extrato bruto	68
4.3 SÍNTESE DE ÉSTERES NA PRESENÇA DE <i>n</i> -HEXANO	70
4.3.1 Procedimento padrão para a reação de síntese do oleato de etila	70
4.3.2 Reutilização de LipC12 imobilizada em reações de síntese do oleato de etila em <i>n</i> -hexano	71
4.3.3 Efeito dos principais parâmetros de reação na síntese do oleato de etila em <i>n</i> -hexano	71
4.3.3.1 Quantidade de enzima	71
4.3.3.2 Temperatura	72
4.3.3.3 Agitação	72
4.3.4 Efeito de diferentes substratos na atividade de esterificação de LipC12 imobilizada em Immobead 150 a partir do extrato bruto	72
4.4 CARACTERIZAÇÃO DE LIPC12 IMOBILIZADA EM IMMOBEAD A PARTIR DO EXTRATO BRUTO	73
4.4.1 Estabilidade ao armazenamento	73
4.4.2 Estabilidade em solventes e à temperatura	73
4.4.3 Regioessetividade	74
4.5 DESENVOLVIMENTO DE APLICAÇÕES PARA IBEAD-EBLipC12	74
4.5.1 Éster do biodiesel - Oleato de etila	75
4.5.2 Éster de aroma - Caprilato de etila	75
4.5.3 Síntese de um lipídio estruturado	76
4.6 MÉTODOS ANALÍTICOS	76
4.6.1 Eletroforese SDS-PAGE	76
4.6.2 Determinação de proteínas	77

4.6.3 Determinação da atividade de hidrólise em meio aquoso pelo método titulométrico (pH-Stat)	77
4.6.4 Determinação da atividade de hidrólise em meio orgânico	78
4.6.5 Determinação dos ácidos graxos livres por método colorimétrico (Lowry-Tinsley)	79
4.6.6 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	79
4.6.7 Cromatografia em fase gasosa	80
4.6.7.1 Quantificação dos etil-ésteres provenientes das reações de esterificação em sistemas livres de solvente.....	81
4.6.7.2 Determinação do perfil de ácidos graxos do triacilglicerol antes e depois da reação de transesterificação ácida (acidólise).....	82
4.6.7.3 Análise posicional dos ácidos graxos presentes no lipídio estruturado	84
4.7 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DAS AMOSTRAS	85
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	86
5.1 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA LIPASE LipC12.....	86
5.1.1 Atividade de hidrólise de LipC12 purificada.....	88
5.1.2 Estabilidade de LipC12 purificada durante armazenamento	89
5.1.3 Atividade de esterificação de LipC12	90
5.2 ESTUDOS DE IMOBILIZAÇÃO DE LIPC12 PURIFICADA	91
5.2.1 Imobilização e caracterização de LipC12 em Accurel MP-1000.....	91
5.2.2 Imobilização e caracterização de LipC12 em Membrana de polipropileno, Celite 545 e Immobead 150	95
5.2.2.1 Produção e ativação da Membrana de Polipropileno	95
5.2.2.2 Seleção do suporte de imobilização	97
5.2.2.3 Atividade de esterificação e conversão em éster	100
5.2.3 Reutilização de LipC12 imobilizada em reações de síntese do oleato de etila	101
5.3 IMOBILIZAÇÃO DE LIPC12 A PARTIR DO EXTRATO BRUTO.....	103
5.3.1 Imobilização e caracterização de LipC12 em Accurel MP-1000 a partir do extrato bruto	103
5.3.1.1 Atividade de esterificação e conversão em éster	106
5.3.2 Imobilização e caracterização de LipC12 no Immobead 150 ativado e não ativado com Cu ²⁺ a partir do extrato bruto.....	107
5.3.2.1 Estudo da carga de proteína ideal para imobilização	110

5.3.2.2 Reutilização de Ibead-EBLipC12 em vários ciclos de esterificação	111
5.3.3 Influência de diferentes condições de imobilização de LipC12 em Immobead .	115
5.4 CARACTERIZAÇÃO DE LIPC12 IMOBILIZADA NO IMMOBEAD 150 A PARTIR DO EXTRATO BRUTO	118
5.4.1 Efeito da massa de enzima imobilizada na reação de esterificação	119
5.4.2 Efeito da temperatura na reação de esterificação	119
5.4.3 Efeito da agitação na reação de esterificação	120
5.4.4 Estabilidade ao armazenamento	121
5.4.5 Estabilidade em solventes orgânicos	123
5.4.6 Estabilidade à temperatura.....	124
5.4.7 Determinação da Regiosseletividade	126
5.4.8 Determinação da Tiposseletividade	128
5.4.9 Efeito do comprimento da cadeia do álcool.....	129
5.5 REAÇÕES DE SÍNTESE EM SISTEMAS LIVRE DE SOLVENTE	131
5.5.1 Síntese do oleato de etila	131
5.5.2 Síntese do caprilato de etila – éster de aroma	133
5.5.3 Síntese de um lipídio estruturado.....	135
6 CONCLUSÕES	138
7 PERSPECTIVAS.....	139
8 REFERÊNCIAS.....	140
APÊNDICES.....	159

1 INTRODUÇÃO

Biocatalisadores vêm sendo amplamente utilizados na indústria devido às suas vantagens sobre os catalisadores químicos, visto que são mais seletivos, biodegradáveis, catalisam reações sob condições brandas e os produtos gerados a partir da biocatálise são considerados naturais, como, por exemplo, aromas (HAMA et al., 2007; KRISHNA et al., 2001). Entre as enzimas mais comumente utilizadas como biocatalisadores estão as lipases (EC 3.1.1.3) que, além de atuarem na reação de hidrólise de triacilgliceróis em meio aquoso (JAEGER et al., 1999; 1994), também catalisam a síntese de ésteres em meio orgânico através de reações de esterificação, transesterificação e interesterificação (BORNSCHEUER et al., 2002). Assim, lipases podem ser aplicadas na síntese de aromas na indústria de alimentos e cosméticos, na produção de sabões, na produção de medicamentos, na modificação de lipídios (lipídios estruturados) e também na produção de biocombustíveis (HASAN et al., 2006).

Lipases de origem microbiana são as mais utilizadas devido a sua maior disponibilidade, estabilidade e, além disso, os custos de produção são menores quando comparadas com lipases não-microbianas. A grande biodiversidade de micro-organismos aumenta sua importância biotecnológica e justifica a busca por novas lipases com características cinéticas diferenciadas (GUPTA et al., 2004; JAEGER e REETZ, 1998). Entretanto, é sabido que apenas 1% dos micro-organismos ambientais são passíveis de cultivo em laboratório. Um método que tem sido explorado para obtenção de enzimas, sem a necessidade de cultivo dos micro-organismos, é a metagenômica, técnica que se baseia no isolamento e clonagem de amostras de DNA ambiental (HENNE et al., 2000; COTTRELL et al., 1999). Recentemente, uma lipase chamada LipC12 foi isolada por Glogauer et al. (2011) de uma biblioteca de metagenômica construída a partir de um solo contaminado com gordura animal. LipC12 possui massa molecular de 33 kDa, uma cadeia monomérica de 293 aminoácidos e maior similaridade com as lipases putativas das bactérias *Yersinia enterocolitica* subsp. *palearctica* (CBY26912) e *Y. enterocolitica* subsp. *enterocolitica* 8081 (Y11 e YE1842), com 72% de identidade (GLOGAUER et al., 2011). LipC12 foi uma das poucas lipases isoladas por metagenômica que apresentaram uma alta atividade contra triacilgliceróis naturais de cadeia longa. Além disso, após sua

caracterização na forma livre, LipC12 mostrou características promissoras para aplicação em biocatálise, como alta estabilidade em solventes orgânicos (30% em água), e em uma ampla faixa de temperatura e de pH (GLOGAUER et al., 2011).

No entanto, mesmo que a abordagem metagenômica facilite a obtenção de lipases com características importantes em biocatálise, o processo de imobilização torna-se essencial para redução do custo do processo biocatalítico, visto que, enzimas imobilizadas podem ser recuperadas do meio reacional e reutilizadas (KNEZEVIC et al., 2006; VILLENEUVE et al., 2000). A imobilização também pode aumentar a estabilidade e a atividade de enzimas, o que propicia a utilização do biocatalisador em processos contínuos. Além disso, o armazenamento, transporte e manuseio do biocatalisador são facilitados.

Considerando que existem diferentes suportes e métodos para a imobilização de enzimas que interferem de maneira distinta nos parâmetros de imobilização, a proposta geral deste trabalho foi estudar diferentes métodos de imobilização da lipase LipC12, fazer sua caracterização na forma imobilizada e desenvolver a aplicação desta lipase na síntese de ésteres. Foram selecionados quatro suportes para a imobilização de LipC12 na forma purificada. Dentre estes, os suportes que proporcionaram melhor eficiência de imobilização e maior atividade de esterificação foram escolhidos para estudos de imobilização de LipC12 diretamente do extrato bruto (EB), sem a etapa de purificação. O suporte que imobilizou uma maior quantidade de proteínas e com isto proporcionou a maior atividade de esterificação foi o copolímero acrílico Immobead 150, o qual foi escolhido para o estudo de caracterização de LipC12 imobilizada. Finalmente, LipC12 imobilizada no suporte Immobead foi aplicada em reações de síntese de diferentes ésteres na presença e ausência de solventes.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi imobilizar a lipase LipC12, isolada de uma biblioteca metagenômica, visando obter preparados imobilizados com alta atividade e estabilidade para utilização na síntese de diferentes ésteres, em sistemas na presença e na ausência de solventes.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I) Selecionar o melhor suporte de imobilização para LipC12 purificada, avaliando-se:
 - A eficiência de imobilização, a carga de proteína no suporte e a retenção de atividade do preparado imobilizado;
 - As atividades de hidrólise e de esterificação em meio orgânico dos preparados imobilizados e suas estabilidades frente a diferentes ciclos de reação.
- II) Utilizando o extrato bruto livre de células de LipC12, estudar os parâmetros de imobilização e as características de LipC12 imobilizada no suporte selecionado na etapa anterior, pela determinação dos seguintes parâmetros:
 - estabilidade ao armazenamento, à temperatura e em solventes orgânicos;
 - regiosseletividade;
 - atividade frente a ácidos graxos com diferentes tamanhos de cadeia e graus de saturação (linoleico, oleico, estearico, palmítico, mirístico, láurico e caprílico), e diferentes tipos de álcoois (metanol, etanol, propanol, iso-propanol e butanol).
- III) Avaliar o desempenho de LipC12 imobilizada em reações de síntese de ésteres do biodiesel, de aromas e de lipídios estruturados em sistemas livres de solvente.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 LIPASES

3.1.1 Definição e características

Carboxilesterases incluem duas classes de enzimas presentes em todos os organismos vivos, designadas de esterases e lipases. As lipases pertencem a um grupo especial de esterases, classificadas como serina hidrolases e contêm uma tríade catalítica composta pelos resíduos dos aminoácidos serina, aspartato (ou glutamato) e histidina (SAXENA et al., 2003). Geralmente, a massa molecular de lipases se encontra na faixa entre 20 a 40 kDa, mas lipases com massas moleculares menores ou maiores também são relatadas, como por exemplo, a lipase de *Fusarium solani pisi*, com 12 kDa (BANDMANN et al., 2000) e a lipase de *Bacillus* sp THL027, com 69 kDa (DHARMSTHITI e LUCHAI, 1999).

As lipases atuam sobre substratos insolúveis em água, em interfaces lipídio/água, hidrolisando preferencialmente acilgliceróis de cadeia longa (acima de 10 átomos de carbono), seus substratos naturais, liberando ácidos graxos e glicerol (JAEGER, DIJKSTRA e REETZ, 1999; JAEGER et al., 1994) (FIGURA 1).

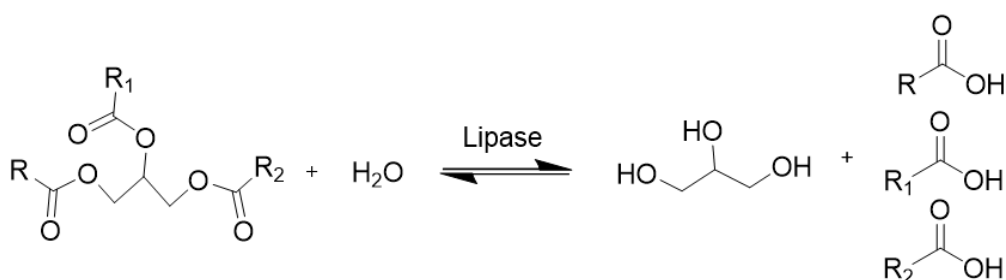


FIGURA 1 - REAÇÃO DE HIDRÓLISE CATALISADA POR LIPASES

Com relação à sua estrutura, as lipases possuem um dobramento característico de α/β hidrolases, que também é encontrado em esterases e proteases. Esterases,

no entanto, atuam sobre triacilgliceróis contendo ácidos graxos de cadeia curta, liberando ácidos graxos de baixa massa molecular, enquanto que lipases, além de triacilgliceróis de cadeia curta, também hidrolisam aqueles contendo ácidos graxos de cadeia longa (JAEGER, DIJKSTRA e REETZ, 1999). Entretanto, mesmo que uma lipase tenha alta atividade contra triacilgliceróis de cadeia longa (≥ 10 átomos de carbono), como o palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP), ela pode não hidrolisar triacilgliceróis naturais que contenham ácidos graxos de cadeia longa, como a trioleína (ARPIGNY et al., 1998; TIRAWONGSAROJ et al., 2008). Sendo assim, o termo “lipase verdadeira” tem sido usado para definir lipases que exibem máxima atividade contra triacilgliceróis insolúveis que contenham ácidos graxos de cadeia longa (ARPIGNY e JAEGER, 1999).

A maioria das lipases possui uma tampa hidrofóbica (*lid*), que controla o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima. A tampa hidrofóbica se move somente na interface lipídio-água, sendo esta uma das explicações para o chamado fenômeno de ativação interfacial (BRADY et al., 1990). Este fenômeno caracteriza-se pela ativação de uma lipase na presença de uma interface óleo-água, causada pela mudança conformacional e exposição do sítio ativo da enzima, permitindo a catálise da reação (BRADY et al., 1990). Entretanto, para algumas lipases observou-se que a presença da “tampa” não está necessariamente correlacionada com a ativação interfacial (THOMAS et al., 2005), como, por exemplo, no caso das lipases de *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia glumae* e *Candida antarctica* B, que apresentam a *lid* em suas estruturas, mas não sofrem ativação interfacial (JAEGER e REETZ, 1998). Por outro lado, algumas lipases possuem uma *lid* incompleta ou não possuem *lid* e não precisam da interface para exercer sua atividade hidrolítica, como é o caso da lipase de *Bacillus subtilis* (ALI et al., 2004; NINI et al., 2001; CYGLER e SCHRAG, 1997).

Em meios aquo-restritos, onde o solvente não é a água, as lipases também exibem atividade de síntese, o que propicia sua utilização em reações de esterificação, transesterificação (alcoólise e acidólise) e interesterificação, apresentando alta especificidade e estabilidade em condições brandas (VILLENEUVE et al., 2000; JAEGER e REETZ, 1998) (FIGURA 2).

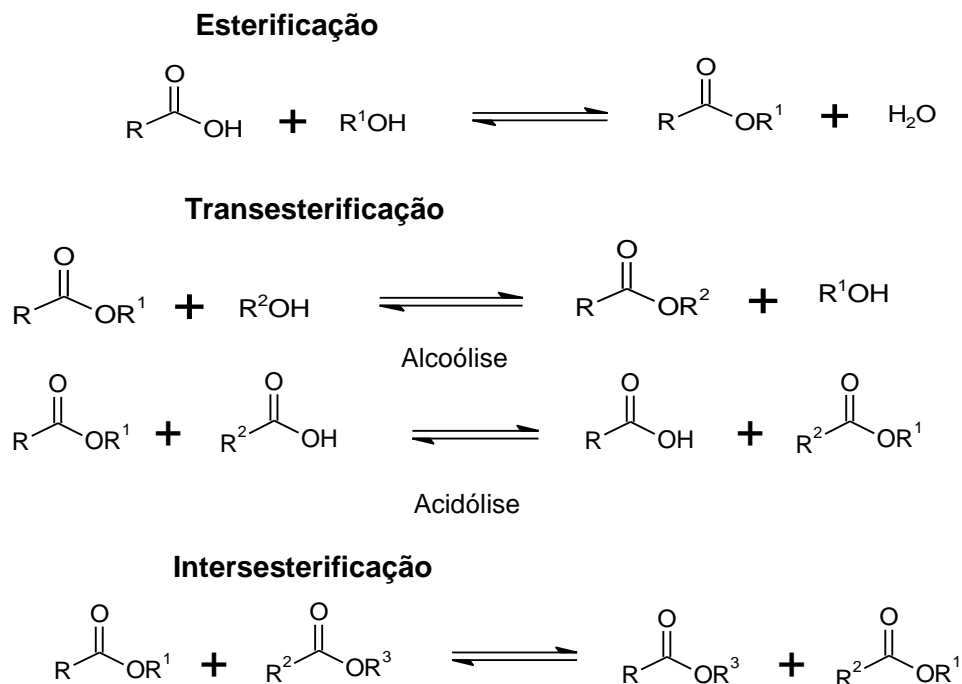


FIGURA 2 - REAÇÕES DE SÍNTESE CATALISADAS POR LIPASES

A catálise enzimática em solventes orgânicos evita problemas como a insolubilidade dos substratos hidrofóbicos e o equilíbrio termodinâmico não-favorável, no caso de reações de síntese, que ocorrem quando a reação é conduzida em meio aquoso (BORNSCHEUER et al., 2002). No entanto, a atividade exibida pelas enzimas em solventes orgânicos é significativamente menor do que em água. Este fenômeno ainda não está bem esclarecido, e é geralmente atribuído ao aumento de rigidez da molécula de proteína ou à desnaturação da proteína por interação com o solvente orgânico (SONG e RHEE, 2001; OGINO e ISHIKAWA, 2001). No caso de utilização de enzimas não-imobilizadas em solventes orgânicos, adicionadas em solução aquosa ou na forma de pó liofilizado, a diminuição da atividade pode ocorrer, além dos motivos citados, também devido à formação de agregados da enzima (KLIBANOV, 1997). Sendo assim, métodos para melhorar o desempenho das enzimas em biocatálise, como por exemplo, a imobilização sobre suportes sólidos, vêm sendo descritos na literatura e utilizados.

3.1.2 Fontes de lipases

Lipases são encontradas em todos os organismos vivos e são classificadas com base na fonte da qual são obtidas, como a microbiana, animal (lipase pancreática) e vegetal (látex do mamão, semente de aveia, semente de mamona). Entretanto, as lipases microbianas são as mais utilizadas industrialmente devido à maior disponibilidade e estabilidade. Além disso, os custos de produção de enzimas microbianas são mais baixos quando comparados com outras fontes. A grande biodiversidade de micro-organismos aumenta a sua importância biotecnológica e justifica a busca por novas lipases (GUPTA, GUPTA e RATHI, 2004; JAEGER e REETZ, 1998). Os fungos filamentosos são considerados os melhores produtores de lipases e atualmente são as fontes preferenciais, uma vez que produzem lipases extracelulares, facilitando a extração dos meios de fermentação, e também porque muitos fungos não são nocivos à saúde humana, sendo reconhecidos como GRAS (Generally Regarded as Safe) (JAEGER et al., 1994). As espécies mais utilizadas pertencem aos gêneros *Rhizopus* sp., *Mucor* sp., *Geotrichum* sp., *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. (HITA et al., 2009). No entanto, na maioria das vezes, métodos-padrão de cultura são limitados pelo fato de que somente aproximadamente 1% dos micro-organismos do ambiente natural pode ser cultivado em laboratório. Isto ocorre geralmente devido às suas respectivas condições de crescimento exigidas serem desconhecidas, ou à sua necessidade de crescer dentro de um consórcio microbiano. Sendo assim, mais de 99% dos micro-organismos ainda não identificados e não explorados podem ser fontes de lipases (HANDELSMAN et al., 1998; TORSVIK, SORHEIM e GOKSOYR, 1996).

3.1.3 Prospecção de lipases em bibliotecas metagenômicas

Um método que tem sido explorado para a descoberta de novas enzimas de interesse biotecnológico é a metagenômica (TIRAWONGSAROJ et al., 2008; REES et al., 2003; COURTOIS et al., 2003; HENNE et al., 2000; COTTRELL, MOORE e KIRCHMAN, 1999).

A técnica de metagenômica (FIGURA 3) baseia-se na seleção e coleta de amostras do ambiente e extração de DNA destas amostras. O DNA é fragmentado e unido a vetores de clonagem, formando uma molécula de DNA circular denominado DNA recombinante. Em seguida, as moléculas de DNA recombinante são inseridas em uma bactéria hospedeira cultivável em laboratório, originando uma coleção de clones chamada de biblioteca metagenômica. A partir desta biblioteca, é realizado um *screening* para as propriedades desejadas; no caso das enzimas, utilizam-se substratos específicos (HANDELSMAN et al., 1998).

Espera-se que enzimas caracterizadas de micro-organismos não cultiváveis em laboratório, especialmente aqueles que existem em ambientes extremos, exibam propriedades especiais, como a alta especificidade e a alta atividade em condições extremas de pH e temperatura, o que pode ser uma vantagem para a utilização em processos industriais (BUNTERNGSOOK et al., 2010).

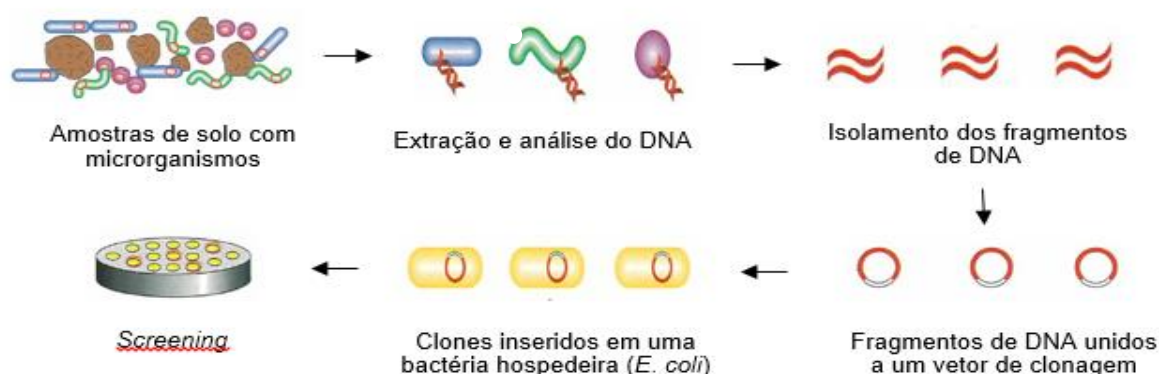


FIGURA 3 – TÉCNICA DE METAGENÔMICA PARA ISOLAMENTO DE ENZIMAS E BIOCOMPOSTOS

Fragmentos grandes de DNA obtidos de micro-organismos de solo são ligados em vetores e inseridos em células hospedeiras de *Escherichia coli*.

Fonte: HANDELSMAN et al. (1998).

Uma vez que não é necessário o cultivo do micro-organismo, a abordagem metagenômica facilita substancialmente a descoberta de novas enzimas e biocompostos a partir de fontes microbianas. Portanto, o número de biocatalisadores obtidos por metagenômica potencialmente úteis aumentou exponencialmente na última década e, conseqüentemente, o número de publicações que envolvem esta

técnica aumentou bruscamente desde o ano 2000, chegando a 658 publicações em 2014 (FIGURA 4) e, até o momento da escrita desta tese (abril de 2015), haviam 135 publicações.

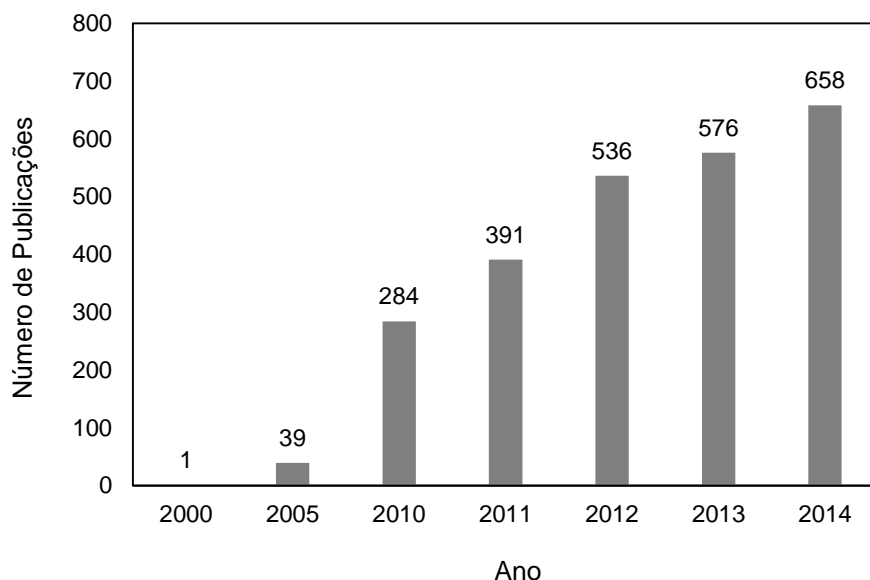


FIGURA 4 – NÚMERO DE PUBLICAÇÕES EM METAGENÔMICA NOS ÚLTIMOS 15 ANOS

Fonte: <http://apps.webofknowledge.com> (Web of Science) em 10/01/2015, palavra-chave: "metagenomic".

3.1.4 A lipase LipC12

Lipases têm sido isoladas pelo método de metagenômica a partir de diferentes amostras ambientais, tais como solos, água do mar e sedimentos marinhos (TABELA 2). Uma delas é a lipase denominada LipC12 isolada por Glogauer et al. (2011) de uma biblioteca metagenômica construída a partir de solo contaminado com gordura animal. LipC12 possui massa molecular de 33 kDa, uma cadeia monomérica de 293 aminoácidos e maior similaridade com as lipases putativas das bactérias *Yersinia enterocolitica* subsp. *polarctica* (CBY26912) e *Y. enterocolitica* subsp. *enterocolitica* 8081 (Y11 e YE1842), com 72% de identidade (GLOGAUER et al., 2011). LipC12 é considerada uma lipase verdadeira por apresentar atividade lipolítica contra

triacilgliceróis de cadeia longa como, por exemplo, aqueles encontrados no azeite de oliva (1722 U mg^{-1}). Além disso, os mesmos autores a caracterizaram na forma livre (TABELA 1) e obtiveram resultados que impulsionaram os estudos da utilização de LipC12 em biocatálise. A lipase apresentou altas atividades de hidrólise contra o triacilgliceróis tributirina (2200 U mg^{-1}) e gordura de porco (1767 U mg^{-1}), o que a torna atrativa para ser utilizada em uma ampla gama de reações com triacilgliceróis de diferentes comprimentos de cadeia. Também foi verificada alta estabilidade por parte de LipC12 em temperatura (0 a 50°C) e em uma ampla faixa de pH (4 a 11) após incubação por 1 h (GLOGAUER et al., 2011). LipC12 foi estável após 48 h de incubação em soluções com 30% de solvente (TABELA 1), permanecendo com 100% da atividade inicial (GLOGAUER et al., 2011).

TABELA 1 - PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DA LIPASE LIPC12

Propriedades	Características
Maior atividade específica	Substratos: Tributirina, gordura de porco e azeite de oliva
Temperatura ótima	30°C
Termoestabilidade	0 a 50°C
pH ótimo	7,5
Estabilidade em pH	4 a 11
*Estabilidade em solventes	Metanol; Etanol; Propanol; Glicerol; Acetona; Dioxano; DMSO

*A estabilidade em solventes orgânicos foi determinada através da análise da atividade enzimática residual após incubação da enzima em soluções com 30% (v/v) de solventes orgânicos em tampão Tris-HCl 200 mol L^{-1} pH 8, CaCl_2 5 mol L^{-1} a 4°C por 48 h.

Fonte: GLOGAUER et al. (2011).

Em outros trabalhos que descrevem a utilização de lipases obtidas por metagenômica (TABELA 2) não foram encontradas atividades de hidrólise tão altas contra triacilgliceróis de cadeia longa quanto a atividade de LipC12 (GLOGAUER et al., 2011). Martini et al. (2014), após caracterização da lipase LipG9, relataram alta atividade de hidrólise para os triacilgliceróis de cadeia curta (1852 U mg^{-1} - tributirina) e média (1566 U mg^{-1} - tricaprilina), mas a atividade diminuiu conforme houve aumento

da cadeia do triacilglicerol, apresentando 807 U mg^{-1} contra trioleína. Fan et al. (2011), isolaram uma lipase termotolerante denominada OSTL28 que apresentou atividade máxima (236 U mg^{-1}) contra o substrato de cadeia média laurato de *p*-nitrofenila (TABELA 2). EML1, uma lipase isolada de uma biblioteca metagenômica derivada de sedimentos marinhos, também apresentou preferência por triacilgliceróis de cadeia média, com uma atividade de 203 U mg^{-1} contra trilaurina (C12) (JEON et al., 2009). Coté e Shareck (2010) relataram que a lipase LipIAF1-6 apresentou altas atividades contra substratos sintéticos (2300 U mg^{-1} contra o palmitato de *p*-nitrofenila), mas não descrevem experimentos com a utilização de triacilgliceróis naturais, como a maioria dos estudos descritos na Tabela 2.

Apesar da maioria das lipases isoladas de bibliotecas metagenômicas não apresentarem alta atividade contra triacilgliceróis naturais, muitas delas como a SMLipA (*Pseudomonas* e *Serratia marcescens*) e Metalip1 (*Pseudomonas* sp. CL-61), apresentaram alta estabilidade na forma livre em solventes orgânicos (TABELA 2). Os autores associam a alta estabilidade e ativação em solventes orgânicos à presença da *lid* na estrutura da enzima, que se mantém na sua conformação aberta após contato com o solvente hidrofóbico (GLOGAUER et al., 2011; COLTON et al., 1995; GROCHULSKI et al., 1993). Vale salientar que na maioria dos estudos (TABELA 2), as enzimas são incubadas em soluções aquosas contendo solventes com concentrações variando entre 10 e 30%.

Poucos estudos relatam a aplicação de lipases isoladas de bibliotecas metagenômicas após superexpressão e purificação. Na Tabela 2, pode-se observar que alguns autores descreveram a utilização de lipases obtidas por metagenômica na síntese de ésteres, mas utilizando-a na sua forma livre, sem a etapa de imobilização. Este é o caso de Zheng et al. (2013) que relatam a utilização da lipase LipZ01/NR liofilizada na síntese do biodiesel, com 92% de conversão em 16 h. Brault et al. (2014) utilizaram células inteiras de *Plesiocystis pacifica* (lipase LipIAF5-2) na síntese do acetato de iso-amila (aroma de banana), com conversão de 100% em 24 h. Uma das lipases obtidas por metagenômica descritas na Tabela 2 que foi imobilizada antes de sua aplicação é a LipG9, a qual foi utilizada na síntese do oleato de etila em *n*-heptano, com 95% de conversão em 7 h (ALNOCH et al., 2015). Entre os estudos que relatam a aplicação da lipase, somente Brault et al. (2014) fez o reuso da enzima durante 5 ciclos (TABELA 2).

TABELA 2 – ESTUDOS RECENTES SOBRE A CARACTERIZAÇÃO DE LIPASES OBTIDAS POR METAGENÔMICA (CONTINUA)

Origem Bliiblioteca	Célula hospedeira	Lipase/Homologia	Atividade / Substrato	Características	Aplicação	Referência
Biomassa de reator em batelada	<i>Streptomyces lividans</i>	LipIAF5.2 / <i>Geobacillus toebii</i> and <i>Symbiobacterium thermophilum</i>	160 U mg ⁻¹ /miristato de <i>p</i> -nitrofenila (C14) a 60 °C e pH 10,5	Ativação após incubação em Ca (115%), Mg (105%), Mn (134%), Co (102%), Tween 20 (101%).	ND	MEILLEUR et al. (2009)
Água do mar	<i>Escherichia coli</i>	LipEH166 /Não mostrou similaridade com nenhuma enzima conhecida	Maior atividade (valor não relatado) contra laurato de <i>p</i> -nitrofenila(C12) a 30 °C e pH 8	Manteve 80% da atividade de hidrólise nas temperaturas entre 25 e 40 °C e entre os valores de pH 5 e 11.	ND	KIM et al. (2009a)
Biomassa de reator em batelada	<i>Streptomyces lividans</i>	LipIAF1-6 / <i>Plesiocystis pacifica</i>	2300 U mg ⁻¹ / palmitato de <i>p</i> -nitrofenila	Manteve 90 a 120% da atividade após incubação de 1 h em acetonitrila, etanol, metanol e iso-propanol (10 e 30% em água).	ND	CÔTÉ e SHARECK (2010)
Mangue	<i>Escherichia coli</i>	LipA / Uncultured bacterium (ACJ13070)	0,87 U mg ⁻¹ / caproato de <i>p</i> -nitrofenila (C10) a 35 °C e pH 8	Manteve 82 a 95% da atividade após incubação entre 20 e 40°C. Estável entre os valores de pH 7 e 9 (atividade não relatada).	ND	COUTO et al. (2010)
Solo	<i>Escherichia coli</i>	EstPS2 / <i>Hypomonos neptunium</i> ; <i>Gemmata obscuriglobus</i> UQM 2246; <i>Hahella chejuensis</i> KCTC 2396	89 U mg ⁻¹ / butirato de <i>p</i> -nitrofenila	Manteve 100% da atividade em pH 5e na temperatura de 35 °C.	ND	BUNTERNGSOOK et al. (2010)
Solo rico em petróleo	<i>Escherichia coli</i>	OSTL28 / <i>Teredinibacter turnera</i> ; <i>Marinobacter algicola</i> ; <i>Saccharophagus degradans</i> ; <i>Moritella</i> sp. PE36	236 U mg ⁻¹ / laurato de <i>p</i> -nitrofenila a 60 °C e pH 7,5	Manteve 80% da atividade entre os valores de pH 4,5 e 9,5.Estável em temperaturas entre 45 e 60 °C (até 100% da atividade foi mantida). Aumento de até 27% na atividade após incubação nos solventes <i>n</i> -hexano, <i>n</i> -dodecano, <i>n</i> -tetradecano e <i>n</i> -hexadecano.	ND	FAN et al. (2011)
Solo	<i>Escherichia coli</i>	SMlipA / <i>Pseudomonas</i> e <i>Serratia marcescens</i>	513 U mg ⁻¹ / acetato de <i>p</i> -nitrofenila a 30 °C e pH 7.	Ativação após incubação de 12 h em soluções de 50% dos seguintes solventes em água: iso-propanol (185%), DMSO (142%), metanol (165%) e <i>n</i> -hexano (201%).	ND	KHAN e JITHESH (2012)

TABELA 2 – ESTUDOS RECENTES SOBRE A CARACTERIZAÇÃO DE LIPASES OBTIDAS POR METAGENÔMICA (CONTINUA)

Origem Biblioteca	Célula hospedeira	Lipase/Homologia	Atividade / Substrato	Características	Aplicação	Referência
Esponja marinha <i>Haliclona simulans</i>	<i>Escherichia coli</i>	Lpc53E1 / <i>Congregibacter litoralis</i> KT71 e <i>proteobacterium</i> NOR5-3	2700 U mg ⁻¹ / palmitato de <i>p</i> -nitrofenila	Estável nos valores de pH entre 7 e 9 (80 a 100% da atividade) Estável em temperaturas de até 80 °C (85% da atividade). Ativação após incubação em soluções com 20% dos seguintes solventes em água: metanol (220%), etanol (208%), propanol (176%), butanol (473%) e <i>n</i> -hexano (195%).	ND	SELVIN et al. (2012)
Solo	<i>Escherichia coli</i>	Lip S - <i>Symbiobacterium thermophilum</i> ; Lip T - <i>Thermus scotoductus</i>	Lip S – 12 U mg ⁻¹ / caprilato de <i>p</i> -nitrofenila Lip T - 0,6 U mg ⁻¹ / caproato de <i>p</i> -nitrofenila	Lip S e Lip T - mantiveram 90% da atividade entre 70 e 75 °C.	Lip S liofilizada – síntese do éster (R) Ibuprofeno de fenila com ee de 99%. Síntese do laurato de propila (0,12 U/mg).	CHOW et al. (2012)
Solo	NR	LipR2/ NR	2652 U mg ⁻¹ / laurato de <i>p</i> -nitrofenila a pH 7 e 45 °C	Manteve 90% da atividade após incubação de 30 min nas temperaturas entre 45 e 50 °C. Estabilidade nos solventes diluídos a 10%: <i>n</i> -hexano (64%); acetona (72%); Metanol (81%); Glicerol (87%).	ND	KUMAR et al. (2013)
Lodo ativado	<i>Escherichia coli</i>	Metalip1/ <i>Pseudomonas</i> sp. CL-61	148 U mg ⁻¹ / butirato de <i>p</i> -nitrofenila 92 U/mg/ palmitato de <i>p</i> -nitrofenila a pH 8 e 45 °C	Ativação após incubação em soluções de 20% dos seguintes solventes em água: metanol (195%), propanol (184%), butanol (185%), iso-octano (159%), <i>n</i> -hexano (130%) e tolueno (140%).	ND	ROH e SCHMID (2013)
Solo	<i>Pichia pastoris</i> GS115	LipZ01 /NR	42 U mL ⁻¹ / óleo de oliva a 45 °C e pH 8	Estável entre os valores de pH 7 e 10 (70-100% da atividade) e nas temperaturas entre 35 e 60 °C (80-100% da atividade). Ativação em Ca ²⁺ (509%) e Mn ²⁺ (151%).	Síntese do biodiesel: 92% de conversão na reação de transesterificação entre óleo de oliva e etanol em 16 h (livre de solvente, lipase liofilizada).	ZHENG et al. (2013)

TABELA 2 – ESTUDOS RECENTES SOBRE A CARACTERIZAÇÃO DE LIPASES OBTIDAS POR METAGENÔMICA (CONCLUSÃO)

Origem Bliiblioteca	Célula hospedeira	Lipase/Homologia	Atividade / Substrato	Características	Aplicação	Referência
Biomassa de reator em batelada	<i>Escherichia coli</i>	LipIAF5-2 / <i>Plesiocystis pacifica</i>	Maior atividade (valor não relatado) contra tributirina (C4) a 40 °C	68% de conversão do éster acetato de iso-amila na presença do solvente iso-octanol.	Síntese do acetato de iso-amila (aroma de banana) com conversão de 100% em 24 h em leite fluidizado. O biocatalisador foi utilizado como célula inteira e pôde ser reciclado por 5 vezes.	BRAULT et al. (2014)
Sedimentos Marinhos	<i>Escherichia coli</i>	Est_p6 / <i>Vibrio splendidus</i> LGP32	3496 U mg ⁻¹ contra o butirato de <i>p</i> -nitrofenila	Após hidrólise da gordura do leite liberou principalmente ácido palmítico (C16) e ácido mirístico (C14). Dados de atividade não relatados.	Possível aplicação na síntese de aromas da gordura do leite.	PENG et al. (2014)
Solo	<i>Escherichia coli</i>	LipG9	2634 U mg ⁻¹ / tricaprilina 911 U mg ⁻¹ / trioleína	Imobilizada em Accurel MP-1000 reteve 50% da atividade após incubação a 60 °C. Após incubação de 8 h nos solventes polares etanol e acetona manteve 85% da atividade.	Síntese do oleato de etila com 95% de conversão 7 h (16 U g ⁻¹ , lipase imobilizada em Accurel MP-1000).	ALNOCH et al. (2015)

ND: não determinado pelo autor

Além de sua caracterização cinética e bioquímica realizada por Glogauer et al. (2011), LipC12 também foi cristalizada e sua estrutura tridimensional determinada por Martini (2012). LipC12 mostrou características típicas da topologia do dobramento α/β hidrolase (cor vermelha, FIGURA 5 A). Pode-se observar que a hélice $\alpha 5$ é a tampa hidrofóbica *lid* (cor verde), a região *N*-terminal começa com a folha $\beta 3$ na cor laranja, e a região C-terminal termina com a hélice $\alpha 9$ (cor azul) (FIGURA 5 A). A sua caracterização estrutural permitiu a verificação dos resíduos que compõem a cavidade catalítica, importantes para especificidade da enzima frente a diferentes substratos, e um possível sítio de mutação genética que pode promover o melhoramento deste biocatalisador foi identificado. A cavidade catalítica da enzima contém vários resíduos hidrofóbicos e alguns hidrofílicos: Gly¹⁵, Leu¹⁶, Tyr²⁸, Gly⁸¹, His⁸², Ser⁸³ (catalítico), Val¹⁰⁹, Ser¹¹³, Val¹¹⁵, Ala¹¹⁶, Val¹¹⁹, Leu¹⁵³, Gly¹⁵⁷, Leu¹⁶¹, Ala¹⁶³, Ala²²², Asp²³⁸ (catalítico), Leu²⁴⁰, Val²⁴¹, His²⁶⁰ (catalítico), Val²⁶¹, Ile²⁶⁴. Na Figura 5 B pode-se observar a tríade catalítica de LipC12, Ser⁸³, Asp²³⁸ e His²⁶⁰ (cor verde). O sítio de mutação genética identificado por Martini et al. (2012) refere-se aos resíduos Trp¹⁸⁴ e Tyr²⁴⁴ que poderiam ser substituídos por duas cisteínas para assim formar uma ponte dissulfeto e promover o aumento da estabilidade térmica da enzima (JAEGER, DIJKSTRA e REETZ, 1999).

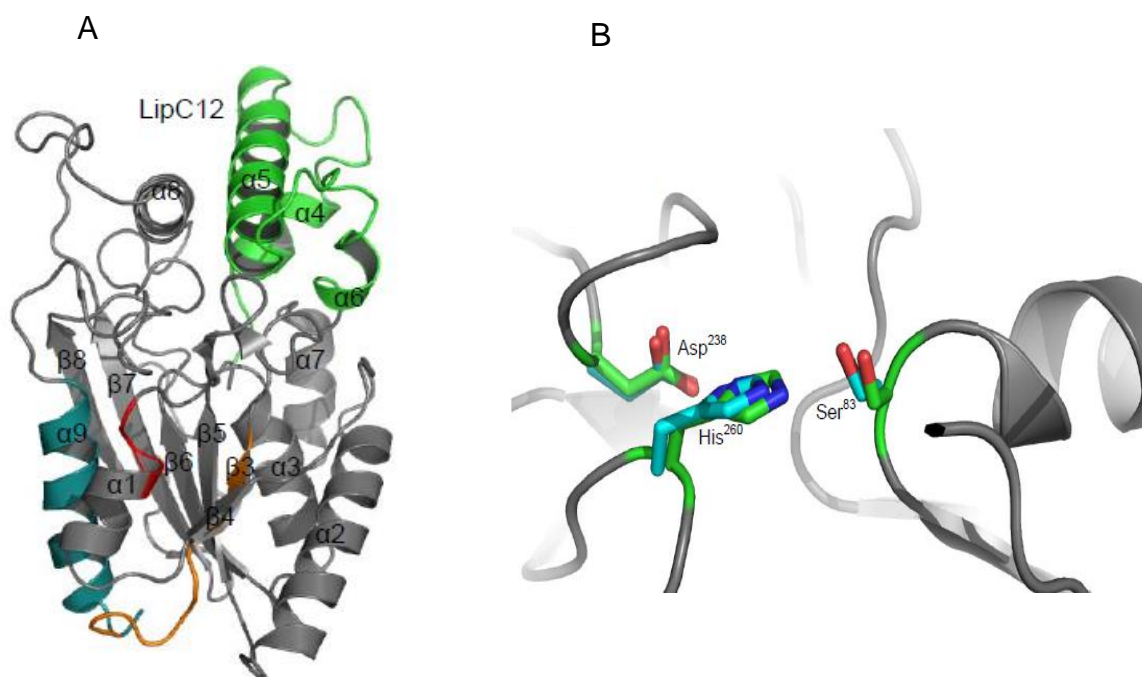


FIGURA 5 – A - ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DE LipC12, B - TRÍADE CATALÍTICA DE LipC12, RESÍDUOS Ser⁸³, Asp²³⁸ e His²⁶⁰ SOBREPOSTA À DA LIPASE DE *Pseudomonas aeruginosa* (PAL). Cor verde para LipC12 e cor azul para PAL (Ser⁸², Asp²²⁹ e His²⁵¹). Fonte: MARTINI (2012).

3.2 IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES COMO UMA ALTERNATIVA PARA MELHORAR A ATIVIDADE E A ESTABILIDADE ENZIMÁTICA

A baixa estabilidade térmica, estabilidade em uma estreita faixa de pH, alta atividade somente em meios aquosos e perda de atividade após o primeiro ciclo de reação são fatores que limitaram o uso de enzimas em vários processos (LIESE e HILTERHAUS, 2013). Na indústria, esta limitação ocorre principalmente pelo alto custo e irrecuperabilidade das enzimas quando utilizadas na forma livre (KAMORI et al., 2000). No entanto, o grande potencial biocatalítico de enzimas, que faz com que possam ser utilizadas em um amplo número de reações, estimulou o estudo para melhora de suas propriedades através de muitas técnicas desenvolvidas principalmente pela microbiologia, engenharia de proteínas e biologia molecular. A técnica de imobilização de enzimas é uma das mais antigas e mais eficientes para melhorar as propriedades do biocatalisador como a estabilidade, a atividade, especificidade, seletividade e redução de inibição (MATEO et al., 2007b).

A imobilização pode tornar a enzima mais estável através de vários mecanismos dependendo do tipo de interação enzima/suporte. Por exemplo, a imobilização por adsorção em um suporte poroso pode estabilizar a enzima por impedir que ela interaja com moléculas do próprio extrato enzimático, prevenindo assim a agregação e até mesmo a proteólise por enzimas presentes no EB, visto que as proteases também estarão imobilizadas.

Quando imobilizada em suportes porosos, a enzima também torna-se mais estável a solventes orgânicos, visto que não forma agregados, como ocorre quando a enzima livre é colocada em contato direto com solventes (COLOMBIE, GAUNAND E LINDET, 2001).

Várias técnicas de imobilização têm sido estudadas e utilizadas para propiciar o desenvolvimento de processos contínuos e realizados em biorreatores (KAMORI et al., 2000). Os parâmetros mais importantes que devem ser avaliados em relação ao suporte de imobilização são força mecânica, estabilidade química e física, caráter hidrofóbico/hidrofílico, capacidade de ligação com a enzima e custo (SOARES et al., 1999).

3.2.1 Principais métodos de imobilização de lipases

Os métodos tradicionais de imobilização de lipases estão mostradas na Figura 6 e dividem-se em: (1) em métodos físicos, nos quais se incluem a adsorção no suporte por interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio ou por interações iônicas, e a encapsulação da enzima em geis de matrizes poliméricas ou em micelas inversas; (2) em métodos químicos, pelo estabelecimento de ligações covalentes entre a enzima e o suporte, por ligações cruzadas entre as próprias moléculas de enzima e por entrelaçamento entre polímeros geleiformes (exemplo: poliacrilamida) (MURTY et al., 2002). Os métodos baseados em adsorção em suportes sólidos e por estabelecimento de ligações covalentes são os mais utilizados e por terem sido objeto de estudo no presente trabalho, serão descritos em detalhes a seguir.

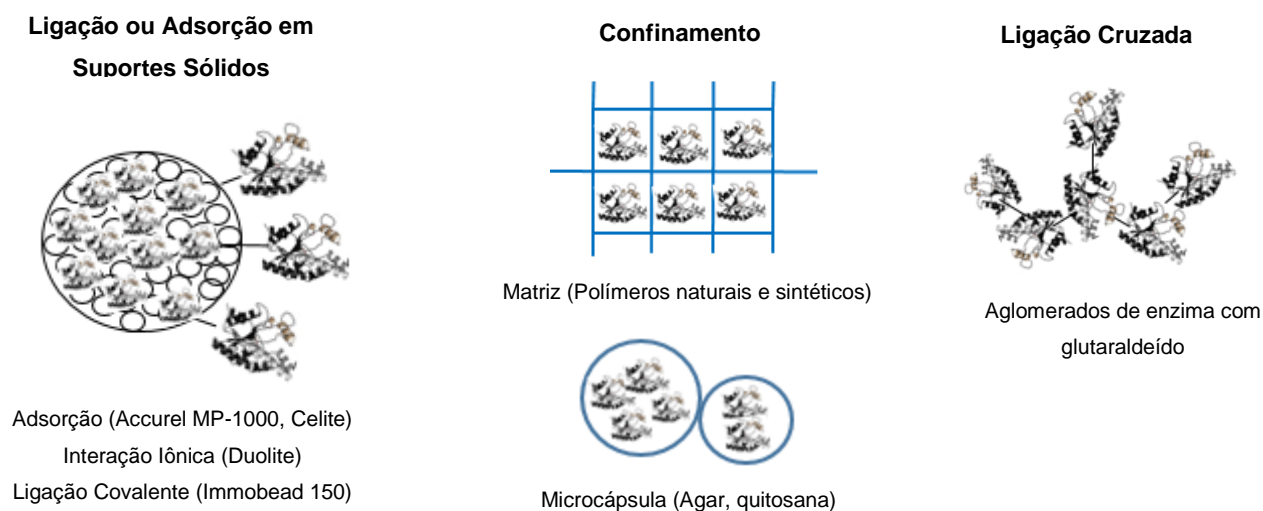


FIGURA 6 -PRINCIPAIS MÉTODOS PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES

Fonte da estrutura da lipase: GLOGAUER (2011) através programa PyMol (DeLANO, 2002).

Fonte da figura: O AUTOR (2015).

3.2.1.1 Adsorção

Este método consiste na adsorção da enzima em um suporte inerte, por meio de interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e forças de van der Waals. É

vantajoso por ser um processo simples, de baixo custo, e nenhuma alteração química no suporte ou na enzima é necessária. Quanto às desvantagens, deve-se considerar a lixiviação da enzima a partir do suporte quando o preparado imobilizado é utilizado em ambientes aquosos (HANEFELD, GARDOSI e MAGNER, 2009).

No caso específico de lipases que apresentam a *lid*, a adsorção por interação hidrofóbica envolve áreas hidrofóbicas em torno do sítio ativo da enzima, que pode ser estabilizado com a *lid* na sua conformação aberta. Portanto, tendo em vista a grande superfície hidrofóbica em torno do sítio ativo, a imobilização de lipases em suportes hidrofóbicos pode propiciar a ativação da maioria das lipases, a seletividade da adsorção que em alguns casos promove a purificação e maior enantioseletividade da lipase (MATEO et al., 2007b). Estas particularidades não ocorrem quando são utilizadas enzimas que possuem resíduos hidrofílicos na superfície. Outro fator que também pode influenciar na adsorção da enzima pelo suporte é o pH da solução enzimática, que propicia a máxima adsorção em valores próximos ao ponto isoelétrico da proteína. Isto ocorre devido ao fato que, no valor de pH correspondente ao ponto isoelétrico da proteína, a repulsão eletrostática entre as moléculas de proteína é minimizada, facilitando a imobilização (VINU, MIYAHARA e ARIGA, 2005; GONÇALVES, 1999).

Os suportes hidrofóbicos Accurel e octil-agarose são os mais estudados quando se trata de imobilização de lipases (SALIS et al., 2008; CAO, BORNSCHEUER e SCHMID, 1999; BATISDA et al., 1998). Particularmente, o suporte Accurel vem sendo muito utilizado em estudos de imobilização de lipases por ser altamente poroso (FIGURA 7) e por sua capacidade de ativação de lipases (ALMEIDA et al., 2008; KAEWTHONG et al., 2005). O suporte Accurel está disponível em diferentes tamanhos de partículas, Accurel MP-1000 (< 1500 µm), Accurel MP-1001 (< 1000 µm), Accurel MP-1004 (< 400 µm) e Accurel E-100 (< 400 µm). O Accurel MP-1004 e Accurel EP-100, devido à sua forma física, um pó fino, pode induzir à compactação do suporte em reações de síntese realizadas em reator de fluxo contínuo, impedindo que haja o fluxo dos substratos (SÉVERAC et al., 2011). No entanto, estes suportes, mesmo com tamanho de partículas pequeno, podem proporcionar à enzima alta atividade e alto rendimento em reações de síntese quando comparados com outros suportes que não fazem interação hidrofóbica com a enzima. No estudo de Kaewthong et al. (2005) foi descrita a maior atividade e estabilidade da lipase de *Pseudomonas* sp. imobilizada em Accurel EP-100 do que quando

imobilizada nos suportes Celite, sílica gel e CaCO_3 . Sabbani, Hedenström e Nordin (2006) relataram que a enantiosseletividade da lipase também pode ser influenciada pelo tamanho da partícula do suporte Accurel. Estes autores imobilizaram a lipase de *Candida rugosa* no Accurel EP-100, Accurel MP-1001 e Accurel MP-1000, e verificaram que a lipase imobilizada no suporte Accurel EP-100 apresentou a maior razão enantiomérica na reação de esterificação entre o ácido 2-metil-hexanoico e 1-decanol em iso-octano. Portanto, a escolha do suporte Accurel para imobilização de lipases deve ser feita com base na aplicação da enzima imobilizada.

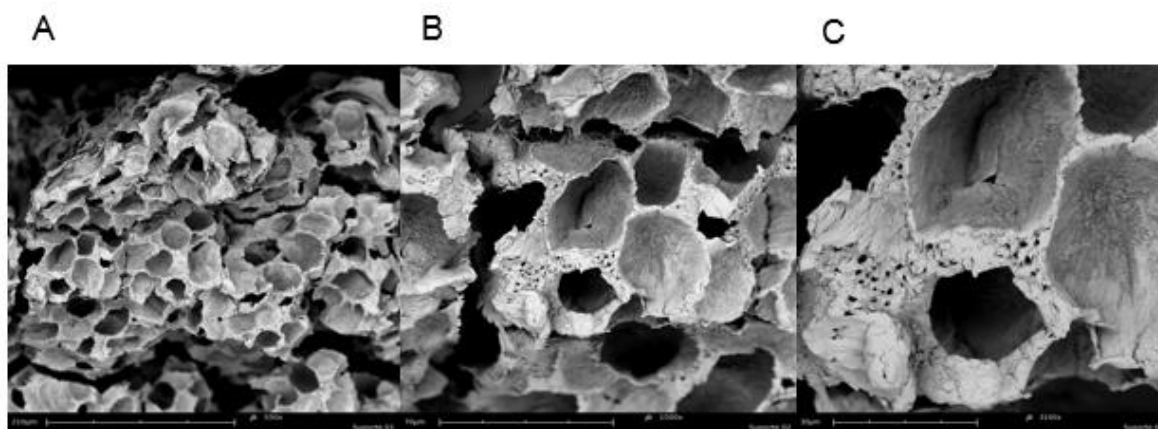


FIGURA 7 - FOTOMICROGRAFIA DO SUPORTE ACCUREL MP-1000

Legenda: (A) aumento de 500 x, (B) aumento de 1500 x, (C) aumento de 3000 x

Fonte: MADALOZZO (2011).

Lipases que, além de resíduos hidrofóbicos, também possuem resíduos hidrofílicos em sua estrutura, podem formar ligações de hidrogênio com suportes hidrofílicos facilmente. São exemplos de suportes hidrofílicos a celulose, lignina, Celite, vidro poroso, argila e sílica gel (MATEO et al., 2007b). Entre estes, um suporte muito utilizado é o Celite, que é um material inerte composto de sílica diatomácea (SiO_2), altamente poroso e por isso, adequado para adsorção física. O Celite é formado pelo tratamento da terra de diatomácea, que consiste de esqueletos silícicos de micro-organismos fossilizados. Durante o tratamento da terra de diatomácea para obtenção do Celite, as partículas de diatomita se fundem, obtendo-se, após moagem, um produto macroporoso e mecanicamente resistente (WISDOM, DUNNIIL e LILLY, 1984). Um crescente interesse na utilização deste suporte ocorreu em décadas

passadas devido as suas características de inércia e porosidade, indicando que, desta forma, ocorreria uma melhor distribuição do catalisador no suporte (KAGA et al., 1994; CHUN e AGATHOE, 1989). No entanto, sua característica hidrofílica o faz ter uma alta capacidade de retenção de água no interior dos poros e, portanto, deve ser utilizado conhecendo-se a aplicação da enzima imobilizada neste suporte. Nos últimos anos, estudos de imobilização de lipases em Celite referem sua utilização em solventes orgânicos, para não haver lixiviação da enzima (PENG et al., 2011; HANEFELD, GARDOSI e MAGNER, 2009).

3.2.1.2 Ligação covalente

Este tipo de imobilização ocorre pela formação de ligações covalentes entre grupos reativos do suporte e alguns grupos funcionais de resíduos de aminoácidos na superfície da enzima (MURTY et al., 2002). A vantagem deste método é a formação de uma ligação muito resistente entre enzima-suporte, o que evita a lixiviação da enzima em meios aquosos e, possibilita a utilização da enzima imobilizada tanto em meios aquosos como em meios orgânicos. Outra vantagem é que, uma enzima imobilizada no suporte por ligações covalentes multipontuais torna-se mais estável se as distâncias originais entre todos os resíduos de aminoácidos envolvidos na imobilização são mantidas inalteradas durante mudanças conformacionais provocadas por agentes como calor, solventes orgânicos e valores extremos de pH (MATEO et al., 2007b).

Entre as desvantagens, pode-se citar os custos mais elevados e o efeito negativo da ligação covalente na conformação cataliticamente ativa da enzima (HANEFELD, GARDOSI e MAGNER, 2009; MATEO et al., 2007b; FORESTI e FERREIRA, 2005).

Uma variedade de suportes tem sido utilizada para este tipo de imobilização, que incluem materiais inorgânicos (MORENO e SINISTERRA, 1995), naturais (CHIOU e WU, 2004) e sintéticos (IVANOV e SCHNEIDER, 1997; BRAUN e KLEIN, 1996; CARTA, GAINER e BENTON, 1991). Suportes contendo grupos epóxido também vêm sendo utilizados para imobilização de enzimas por ligação covalente (NUNES et al., 2011). Estes suportes são muito desejados para imobilização em escala industrial

porque estão disponíveis no mercado mundial, conferem alta estabilidade operacional do preparado imobilizado e são adaptáveis a uma variedade de processos em reatores (KATCHALSKI-KATZIR e KRAEMER, 2000). Um exemplo de suporte ativado com grupos epóxido é o Eupergit C, atualmente vendido como Immobead. Este suporte consiste em microesferas macroporosas desenvolvidas a partir da copolimerização de N', N'- metileno-bis-metacrilamida, glicidil-metacrilato, alil-glicidil-éter e metacrilamida (KNEZEVIC et al., 2006; KATCHALSKI-KATZIR e KRAEMER, 2000). A alta densidade dos grupos epóxido na superfície das microesferas (600 mol g⁻¹ de suporte seco) promove a ligação covalente com a enzima em vários sítios de sua estrutura. Este fenômeno é conhecido como ligação multi-pontual e é o fator mais importante para a estabilidade operacional de enzimas imobilizadas neste tipo de suporte (KATCHALSKI-KATZIR e KRAEMER, 2000).

3.2.2 Imobilização de enzimas portadoras de cauda de histidina

Uma técnica bastante comum na purificação de lipases é a expressão da enzima com uma cauda de histidina ou “cauda His” (sequência de seis resíduos de histidina na posição N-terminal), a qual permite sua separação de outros componentes da célula por cromatografia de afinidade em coluna previamente carregada com um metal, como o níquel ou cobre.

Entretanto, em relação à imobilização, a lipase com cauda His tem um comportamento diferente daquela sem essa modificação. Quando utilizada em técnicas de imobilização baseadas em interações físicas (adsorção), pode haver baixa eficiência de imobilização. Segundo Horchani et al. (2009), isto é decorrente da interferência da cauda His que altera tanto a formação das interações enzima-suporte, quanto a estrutura da lipase.

Para contornar os problemas de imobilização de lipases com cauda His em certos tipos de suportes, tem sido descrita a remoção da cauda His da enzima utilizando trombina (HORCHANI et al., 2010; 2009). Para que ocorra esta clivagem, o vetor de expressão deve conter o sítio para trombina (Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser), localizado posteriormente à cauda His. No entanto, existem algumas desvantagens na utilização deste método, como clivagens não-específicas, adição de aminoácidos

extras na estrutura da enzima, remoção parcial da cauda His e presença de proteases contaminantes na preparação (RENZI et al., 2006).

Uma alternativa para imobilização de enzimas contendo cauda His, foi descrita por Mateo et al. (2001), que associaram as propriedades de um suporte contendo grupos epóxido (3.2.1.2) com a possibilidade de imobilização seletiva da enzima. A técnica compreende duas etapas: 1) adsorção da enzima no suporte através da cauda His e 2) formação de ligações covalentes entre os grupos epóxido e grupos nucleofílicos da enzima (FIGURA 8) (MATEO et al., 2001). Na primeira etapa, o suporte é ativado antes da imobilização por complexação com íons Cu^{2+} , Co^{2+} ou Ni^{2+} que, em seguida, durante a imobilização, interagem com os anéis imidazólicos existentes nos resíduos de histidina, promovendo adsorção seletiva da enzima. Na segunda etapa, ocorre o estabelecimento de ligações covalentes entre o suporte e os grupos nucleofílicos da enzima, principalmente $-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$ e $-\text{OH}$. Nesta etapa, dependendo do tempo de incubação, do pH e temperatura, as ligações podem ser multi-pontuais, proporcionando maior estabilidade, mas uma possível redução da atividade da enzima imobilizada pode ocorrer.

Por outro lado, apenas existem trabalhos nos quais as enzimas sem cauda His são imobilizadas em suportes contendo grupos epóxido sem ativação com íons metálicos, com estabelecimento das ligações covalentes através dos grupos nucleofílicos da enzima e grupos epóxido do suporte (KNEZEVIC et al., 2006; KATCHALSKI-KATZIR e KRAEMER, 2000).

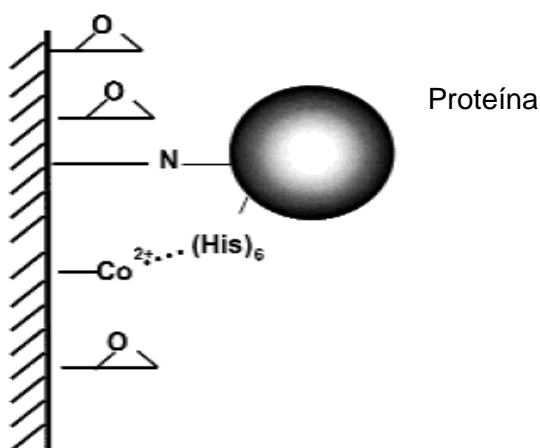


FIGURA 8 – REPRESENTAÇÃO DA IMOBILIZAÇÃO DE UMA PROTEÍNA NO SUPORTE CONTENDO GRUPOS EPÓXIDO ATIVADO COM ÍONS Co^{2+} ATRAVÉS DA ADSORÇÃO SELETIVA E LIGAÇÃO COVALENTE. Fonte: MATEO et al. (2001).

3.2.3 Efeito da imobilização sobre a atividade e especificidade da enzima

As propriedades catalíticas de enzimas imobilizadas dependem do tipo de suporte utilizado na imobilização, das interações enzima-suporte e dos efeitos difusionais, ou seja, da interação enzima-substrato. Em suportes porosos, duas limitações difusionais são normalmente identificadas: as limitações externas, que se referem ao transporte do substrato a partir de uma solução para a superfície do suporte, e as limitações internas, que se referem ao transporte do substrato no interior do suporte poroso até o sítio ativo da enzima (ENGASSER e HORVATH, 1976). Assim sendo, devido aos efeitos difusionais, a atividade de uma enzima imobilizada em um suporte poroso será tanto maior quanto maior for a solubilidade do substrato no meio reacional utilizado. Em caso de substratos insolúveis em água, que é o caso de lipases, a agitação pode promover a maior interação enzima-substrato.

A especificidade de uma lipase frente a diferentes substratos pode ser modificada dependendo do suporte em que está imobilizada e do meio reacional utilizado para medida da atividade. Por exemplo, se a atividade da enzima livre é maior contra substratos insolúveis, após imobilização esta atividade poderá ser menor se o acesso do substrato ao suporte poroso for limitado. Portanto, a especificidade da enzima imobilizada pode ser alterada pela menor concentração do substrato no microambiente da lipase imobilizada (devido aos efeitos de partição), pela alteração conformacional da lipase mediante a imobilização e impedimento estérico, que pode tornar a enzima menos acessível para o substrato (PENCREACH, LEULLIER e BARATTI, 1997).

Outro fator que interfere na atividade do preparado imobilizado é a carga de proteína imobilizada sobre o suporte (SOARES et al., 1999). O efeito da carga de proteína em um suporte poroso foi alvo de estudo por Almeida et al. (2008), na imobilização de uma esterase de *Pyrococcus furiosus* no Accurel MP-1000. Os autores verificaram que quando há uma alta carga de proteína no suporte, pode haver a formação de múltiplas camadas de proteínas no interior dos poros. Nesta condição, ou quando todos os poros estão preenchidos com a enzima, a ativação da enzima imobilizada é mínima (6%). Segundo Montero et al. (1993), a limitada ativação da enzima no suporte saturado, descrita no trabalho de Almeida et al. (2008), pode ocorrer porque as moléculas de enzima penetram em locais da matriz que ficam

inacessíveis ao substrato, e também pela formação de multicamadas, que impossibilita o acesso ao substrato pelas camadas mais inferiores. Por outro lado, utilizando-se baixas cargas de proteína, grande parte da superfície do suporte permanece disponível para outras ligações. Assim, tendo em vista a forte afinidade da lipase para o suporte, as interações são maximizadas, o que resulta em uma perda de conformação e, por conseguinte, em uma redução de atividade (MONTERO et al., 1993). Portanto, a hiperativação é encontrada para cargas de proteínas intermediárias, onde um microambiente que maximiza a eficiência catalítica da lipase é formado (ALMEIDA et al., 2008).

A hidrofobicidade do suporte utilizado também pode influenciar a atividade do biocatalisador. Se o suporte for hidrofóbico, a concentração local de substratos em torno da lipase adsorvida é maior do que para a lipase na forma livre. Este fato também pode justificar a ativação da lipase neste tipo de suporte (RESLOW, ADLERCREUTZ e MATTIASSON, 1988). Portanto, o uso de suportes de natureza macro ou microporosa de carácter hidrofóbico (polipropileno ou polietileno) proporciona um bom desempenho da lipase imobilizada (MALCATA et al., 1990). Em contrapartida, suportes hidrofílicos são geralmente caracterizados por promover perda de atividade da lipase após imobilização. Isto é atribuído aos seguintes fatores: alteração na conformação da lipase após a adsorção; quando uma pequena quantidade de lipase é adsorvida; redução da capacidade de substratos hidrofóbicos em alcançar o sítio ativo da lipase; ou existência de impedimento estérico imposto pelo suporte que limita a flexibilidade da molécula de proteína (MALCATA et al., 1990).

Com base no que foi exposto acima entende-se que, ao estudar o efeito da imobilização na própria enzima, é importante assegurar que as limitações difusionais não afetem a taxa de reação e a cinética da enzima imobilizada. Limitações externas e internas podem ser superadas por meio de alterações de parâmetros, como a agitação do meio reacional, a carga de proteína no suporte, o tipo de suporte (hidrofílico ou hidrofóbico) e do meio reacional em que a lipase imobilizada será empregada.

3.3 APLICAÇÃO DE LIPASES EM BIOCATÁLISE

3.3.1 Características importantes para aplicação de lipases em biocatálise

3.3.1.1 Estabilidade em solventes orgânicos

Solventes orgânicos são essenciais para maioria das reações de síntese. No entanto, quando comparado com o meio aquoso, o meio orgânico exige uma maior atividade e estabilidade enzimática (DOUKYU e OGINO, 2010). Mesmo as lipases que possuem alta atividade em meio aquoso tendem a ter menor atividade em meio não-aquoso (cerca de 4 a 5 vezes menor). Vários fatores podem contribuir para este efeito; dentre eles citam-se a perturbação da estrutura terciária da proteína devido à mudança para um meio hidrofóbico (solventes orgânicos), flexibilidade conformacional limitada, dessolvatação do sítio ativo resultando na ligação limitada enzima-substrato e a desnaturação interfacial da enzima (DOUKYU e OGINO, 2010; SERDAKOWSKI et al., 2007).

O valor do $\log P$ (coeficiente de partição do octanol em água) (TABELA 3) é o principal parâmetro utilizado para descrever a polaridade do solvente e seus principais efeitos na atividade da enzima (LAANE et al., 1987). Solventes apolares (valores de $\log P > 2,5$) podem reduzir a atividade por provocar rigidez na estrutura proteica. Já solventes polares (valores de $\log P < 2,5$) agem principalmente na retirada da camada de água essencial em torno da enzima, necessária para a manutenção da sua estrutura tridimensional ativa (DOUKYU e OGINO, 2010).

Entretanto, mesmo havendo algumas desvantagens em relação à atividade da enzima, outros fatores contribuem para o sucesso das reações enzimáticas em meio orgânico, como, por exemplo, o aumento da solubilidade dos substratos, a facilidade de recuperação da enzima e do produto, a prevenção da contaminação microbiana e, em reações de síntese, o aumento da velocidade de reação, deslocando o equilíbrio no sentido da formação do produto (KRIEGER et al., 2004). Sendo assim, várias metodologias vêm sendo descritas para tentar resolver o problema de instabilidade da enzima em solventes e dentre estas podem-se citar a imobilização em suportes

insolúveis, a modificação química da enzima, a modificação física da enzima com lipídios e surfactantes, e a engenharia molecular de enzimas.

Algumas enzimas descritas na literatura já possuem maior tolerância a solventes naturalmente. Ogino et al. (2000) isolaram uma lipase (LST-03) de *Pseudomonas aeruginosa* que apresentou, após purificação e caracterização, alta estabilidade em solventes apolares (*n*-decano, *n*-octano, dimetil sulfóxido-DMSO) mas reduzida atividade em solventes polares (etanol e metanol). Neste mesmo estudo, outras duas lipases foram isoladas do mesmo micro-organismo e seus genes clonados em *E. coli* e não apresentaram resistência a solventes, indicando que nem todas as proteínas isoladas de um micro-organismo resistente a solventes terão a mesma característica. Uma lipase produzida por *Pseudomonas aeruginosa* AAU2 também foi mais estável em solventes orgânicos com $\log P \geq 3,1$, retendo mais que 70% de sua atividade após 24 h de incubação, e um aumento da atividade (102%) foi observado na presença de altas concentrações de iso-octano em água (75%, v/v) (BOSE e KEHARIA, 2013).

TABELA 3 - VALORES DE Log P DE ALGUNS SOLVENTES ORGÂNICOS

Solvente	Log P	Solvente	Log P
Dimetil sulfóxido (DMSO)	-1,3	Clorofórmio	2,0
Dioxano	-1,1	Benzeno	2,0
<i>N,N</i> -dimetilforamida (DMF)	-1,0	Tolueno	2,5
Metanol	-0,76	Éter dibutílico	2,9
Acetonitrila	-0,33	Tetracloro de carbono	3,0
Etanol	-0,24	<i>n</i> -Pentano	3,0
Acetona	-0,23	Ciclohexano	3,2
Propanol	0,28	<i>n</i> -Hexano	3,5
Acetato de etila	0,68	<i>n</i> -Heptano	4,0
Butanol	0,80	<i>n</i> -Octano	4,5
Éter dietílico	0,85	Dodecanol	5,0
Acetato de butila	1,7	Dodecano	6,6
Éter dipropílico	1,9	Ftalato de dioctila	9,6

Fonte: LAANE et al. (1987).

A metagenômica é um método que também tem sido utilizado para prospectar lipases estáveis em solventes orgânicos e algumas já foram descritas na literatura, conforme foi observado na Tabela 2 (Seção 3.1.4). Selvin et al. (2012), Glogauer et al. (2011) e Côté e Shareck (2010) relataram ativação das lipases após incubação em solventes polares e apolares (10 a 30% em água) (TABELA 2, Seção 3.1.4). Entretanto, a verificação da estabilidade da lipase em solventes puros é mais interessante, visto que a maioria das reações de síntese ocorre em meio orgânico sem a presença de água livre.

3.3.1.2 Estabilidade e atividade em diferentes temperaturas

Uma das vantagens de se utilizar um catalisador biológico, ao invés de um catalisador químico, é a atuação em condições reacionais brandas. Porém, muitos processos industriais necessitam utilizar temperaturas mais elevadas do que a faixa de estabilidade usual de atividade de enzimas (30 a 45 °C). Reações que são realizadas a temperaturas mais elevadas ocorrem em um menor tempo, tanto pelo aumento da solubilidade de substratos e produtos, como pelo deslocamento favorável em reações endotérmicas (VIEILLE e ZEIKUS, 2001).

Por outro lado, quando uma alta temperatura é utilizada no sistema, o aumento da energia molecular interna afeta a flexibilidade da proteína e isto, consequentemente, pode alterar sua atividade e estabilidade (TRAMPER, 1994). Isto acontece porque o aumento da energia química pode desfazer ligações fracas que mantêm a estrutura tridimensional ativa das proteínas, o que provoca sua desnaturação térmica e inativação (TRAMPER, 1994). Assim, a busca por novas lipases tolerantes a altas temperaturas tem sido feita através de isolamento e cultivo de micro-organismos termotolerantes ou também através da técnica de metagenômica. Alguns trabalhos relatam que as lipases e esterases apresentam temperaturas ótimas mais elevadas do que a temperatura ótima de cultivo dos micro-organismos de origem ou do ambiente no qual foram isoladas (HU et al., 2010). No estudo de Biver et al. (2013), três esterases foram isoladas por metagenômica de um solo de floresta e duas delas apresentaram alta atividade nas temperaturas entre 45 e 50 °C, sendo que a temperatura do seu ambiente de origem era 35 °C.

A termoestabilidade de uma enzima pode estar relacionada à presença de pontes dissulfeto e pontes salinas no interior da estrutura. Além disso, a hidrofobicidade na superfície da proteína, presença de resíduos de aminoácidos polares que formam ligações de hidrogênio, e aminoácidos carregados que podem formar interações iônicas adicionais, também são características de enzimas termoestáveis. Isto porque estas características são responsáveis pela maior rigidez da estrutura da enzima e consequentemente há uma maior estabilidade a temperatura (DALHUS et al., 2002).

Muitas lipases provenientes de bibliotecas metagenômicas têm mostrado estabilidade em elevadas temperaturas como descrito por Fan et al. (2011), Selvin et al. (2012), Chow et al. (2012) e Zheng et al. (2013) (TABELA 2). No entanto, em alguns destes estudos são relatadas técnicas para o isolamento somente de enzimas termofílicas, conforme foi descrito por Chow et al. (2012). Estes autores fizeram o isolamento de duas lipases de metagenômica do solo de um jardim botânico (Klein Flottbek, Hamburg, Germany) e, para selecionar fragmentos de DNA de micro-organismos capazes de produzir enzimas termoestáveis, utilizaram um método de enriquecimento da amostra de solo com óleo de oliva, aminoácidos, vitaminas e sais minerais, e incubação em temperaturas de 65 e 75 °C. Embora esta técnica tenha reduzido significativamente a biodiversidade da amostra ambiental, as lipases isoladas mantiveram 90% da atividade após incubação em temperaturas entre 70 e 75 °C.

Quando uma enzima não é termoestável na sua forma livre, a imobilização é um dos métodos mais utilizados para o aumento da estabilidade térmica. A estabilidade térmica da lipase imobilizada é maior do que da enzima livre, porque a ligação com o suporte evita a perda da conformação catalicamente ativa da enzima em altas temperaturas (KIM, GRATE e WANG, 2006).

3.3.1.3 Regiosseletividade, tiposseletividade e enantioseletividade

A especificidade posicional (regiosseletividade) de lipases define-se pela hidrólise preferencial das ligações éster *sn*-1 e 3 do triacilglicerol (lipases *sn*-1,3 específicas), da ligação éster *sn*-3 (lipases *sn*-3 específicas), ou da ligação éster *sn*-2

(lipases *sn*-2 específicas). Lipases que hidrolisam as ligações éster das três posições do triacilglicerol são consideradas não-específicas (OTA, SOWAMOTO e HASUO, 2000).

A regioseletividade de lipases é decorrente da orientação imposta pelas dimensões e pela estrutura do sítio ativo à ligação do substrato (PARK et al., 1999) e esta propriedade pode ser utilizada na síntese de lipídios estruturados, principalmente para fins nutracêuticos, como está descrito em 3.3.3 (Lipídios estruturados).

A especificidade em relação ao comprimento da cadeia e grau de saturação de um ácido graxo pode ser chamada de tiposseletividade e é outra característica importante de lipases quando se trata da sua aplicação em biocatálise. A tiposseletividade deve ser investigada a fim de se obter um melhor entendimento em relação à estrutura e função da enzima, bem como para obter informações para melhor aplicação como biocatalisador (STAMATIS et al., 1993). Cada enzima age diferentemente sobre o substrato, pois a tiposseletividade depende primariamente da estrutura da enzima, como, por exemplo, da hidrofobicidade dos resíduos de aminoácidos do sítio ativo. Ácidos graxos de cadeia longa podem criar um impedimento estérico para a formação do complexo acil-enzima, mas a presença da dupla ligação pode facilitar a ligação do sítio ativo com o substrato. No entanto, estes fatores dependem do tipo e da quantidade de resíduos de aminoácidos (hidrofóbicos ou hidrofílicos) que compõem o sítio ativo (YADAV e DEVENDRAN, 2012).

As lipases também possuem um grande potencial para síntese de compostos quirais opticamente puros, por apresentarem enantiosseletividade, ou seja, discriminação entre enantiômeros de uma mistura racêmica. Compostos quirais têm grande importância na indústria farmacêutica, pois, nos últimos anos, drogas administradas como racematos que causam efeitos colaterais indesejados, têm sido substituídas por compostos enantiomericamente puros. Intermediários de fármacos e pesticidas também são compostos quirais obtidos pela resolução cinética catalisada por lipases (SHARMA, SHARMA e SHUKLA, 2011).

A resolução cinética enzimática baseia-se na capacidade da enzima em reagir sob diferentes velocidades com os dois enantiômeros, com formação preferencial de um enantiômero em relação ao outro (FABER, 2000). O reconhecimento quiral por enzimas ocorre quando há complementaridade do substrato ao sítio ativo da enzima e pode ser explicado através de um modelo de ligação de três pontos do substrato ao sítio ativo da enzima para ocorrer a enantiosseletividade. O enantiômero que permitir

a melhor interação dos grupos substituintes por complementariedade com o sítio ativo da enzima será, portanto, o enantiômero preferido (FABER, 2000).

Mais especificamente para lipases, a enantiosseletividade frente a álcoois secundários é explicada pela chamada “Regra de Kazlauskas”. O reconhecimento quiral ocorre com base no tamanho e na forma das moléculas quando estas estão no sítio ativo da enzima, o qual consiste de duas regiões de diferentes tamanhos, uma grande e outra pequena (KAZLAUSKAS et al., 1991). Quando o álcool secundário é submetido à resolução por uma lipase enantiosseletiva, liga-se ao sítio ativo da enzima com maior eficiência do que o outro (FIGURA 9a). Se o outro enantiômero reage com a enzima, o substrato é forçado a acomodar seu maior substituinte no menor espaço do sítio ativo (FIGURA 9b), causando um impedimento estérico que supostamente perturba a tríade catalítica, diminuindo a velocidade de reação para este enantiômero (GHANEM, 2007).

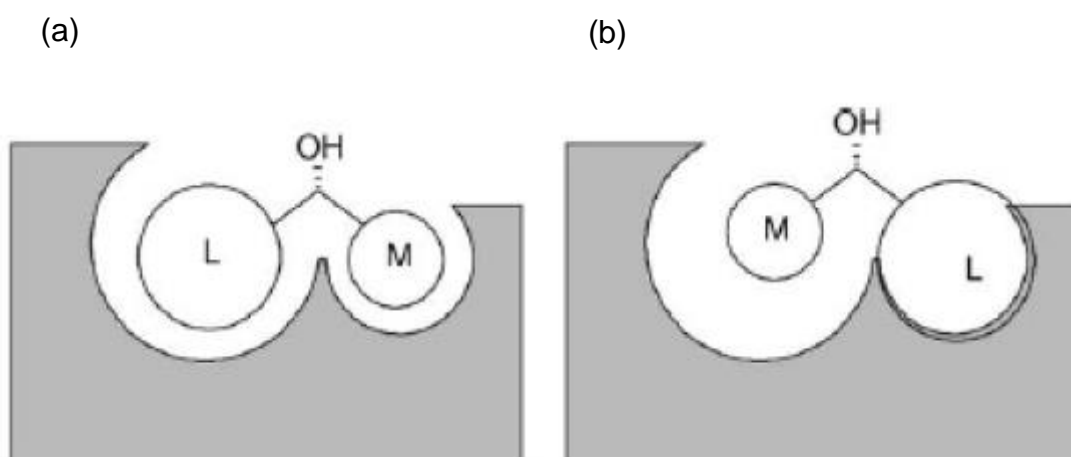


FIGURA 9 - (a) ENANTIÔMERO DE REAÇÃO MAIS RÁPIDA, (b) ENANTIÔMERO DE REAÇÃO MAIS LENTA NO MODELO SÍTIO ATIVO PARA LIPASES DERIVADO DA REGRA DE KAZLAUSKAS et al. (1991)

Fonte: GHANEM (2007).

A enantiosseletividade de lipases varia muito de acordo com a origem biológica, substrato, o solvente utilizado na reação, e com a temperatura e também pode ser afetada pela imobilização da enzima (YU et al., 2007; SABANNI et al., 2006).

3.3.2 Sistemas reacionais utilizados em biocatálise com lipases

Os sistemas reacionais utilizados em biocatálise geralmente são aquo-restritos, compostos por solventes orgânicos, líquidos iônicos, fluídos supercríticos, fases gasosas e sólidas (KRIEGER et al., 2004; ADLERCREUTZ, 2000). Quando se trata da síntese de ésteres do biodiesel ou de aromas, e da síntese de lipídios estruturados, que foram estudados neste trabalho, as reações são realizadas principalmente na presença de solventes exógenos, e em sistema livre de solvente, onde o meio reacional é composto apenas pelos substratos da reação.

Solventes hidrofóbicos (valores de $\log P > 2,5$) (3.3.1.1) são os mais utilizados como solventes em sistemas reacionais catalisados por lipases, porque são menos nocivos à enzima, visto que interagem menos com a água de hidratação necessária para manter a enzima cataliticamente ativa (KRISHNA e KARANTH, 2002). Além disso, solventes hidrofóbicos promovem maior estabilidade à estrutura da enzima através de alterações conformacionais na *lid*, provocando a abertura da tampa hidrofóbica, deixando o sítio ativo disponível para a catálise (RÚA et al., 1993). No entanto, a utilização de solventes no meio reacional apresenta algumas desvantagens como problemas de separação do produto, toxicidade e inflamabilidade de solventes orgânicos e aumento do custo do processo. Assim, a biocatálise em sistemas livre de solvente está sendo cada vez mais utilizada, visto que permite a recuperação do produto sem as etapas de purificação ou evaporação, e a utilização dos substratos em altas concentrações (QIN et al., 2008; SELMI, et al., 1997).

Mesmo que sistemas livres de solvente apresentem as vantagens descritas acima, algumas dificuldades podem ser encontradas, como, por exemplo, o aumento da viscosidade do meio reacional e a atividade enzimática reduzida (HALLING, 1990). Esta redução da atividade da enzima é geralmente provocada pela presença de altas concentrações de substratos, mais especificamente o metanol e o etanol, no caso de reações que utilizam estes solventes como substratos. A alta hidrofiliidade do metanol e etanol pode causar a desnaturação da enzima pela remoção da água de hidratação necessária para a manutenção da estrutura cataliticamente ativa (KAIEDA et al., 2001; SHIMADA et al., 1999). A inativação da enzima pode ocorrer também por inibição competitiva, onde moléculas do álcool se ligam reversivelmente ao sítio ativo da enzima, diminuindo o acesso do substrato hidrofóbico (NOUREDINI; GAO;

PHILKANA, 2005). Para tentar solucionar este problema, uma estratégia que vem sendo utilizada é a adição do álcool em etapas, em que é possível atingir um alto rendimento com condições de funcionamento simples (MADALOZZO et al., 2014; SALUM et al., 2010; TAN, LU e NIE, 2010).

3.3.3 Aplicações de lipases na síntese de ésteres

Ésteres são amplamente utilizados na indústria química, farmacêutica, de aromas, cosméticos, alimentos e bebidas. Eles também podem ser utilizados como lubrificantes em máquinas de alta precisão em indústrias mecânicas e de automóveis. Tradicionalmente, os ésteres são sintetizados através de uma reação química entre um álcool e um ácido orgânico ou um triacilglicerol, na presença de ácidos tais como ácido sulfúrico, ácido *p*-tolueno sulfônico e ácido fosfórico, os quais são utilizados como catalisadores homogêneos (YADAV e MEHTA, 1994). A reação catalisada por um álcali também é adotada no processo químico convencional de produção de ésteres. Os catalisadores mais utilizados neste processo são os alcóxidos de metais alcalinos, bem como carbonatos de sódio e potássio (SCHUCHARDT, SERCHELI e VARGAS, 1998). Porém, estes processos apresentam inconvenientes, como altas temperaturas e pressões, uso de produtos químicos perigosos, equipamentos de alto custo à prova de corrosão, dificuldade de separação do glicerol e a necessidade de eliminar o catalisador e o sal formado. Diferentes estratégias têm sido adotadas para resolver estes problemas e tornar o processo ambientalmente benéfico, dentre elas a modificação das condições de reação, desenvolvimento de catalisadores reutilizáveis (BOKADE e YADAV, 2009; YADAV e MEHTA, 1994) e uso de biocatalisadores (HAMA et al., 2007).

Reações de esterificação e transesterificação catalisadas por lipases estão entre as alternativas mais promissoras para os métodos químicos tradicionais. O uso de lipases possui vantagens como especificidade a diferentes substratos, regio e estereosseletividade, não necessitam de co-fatores, atuam sob condições amenas, e necessitam de pouca energia (KRISHNA et al., 2001). No entanto, o rendimento em éster dos processos catalisados por enzimas pode ser inferior se comparado aos processos realizados por catálise química. Além disso, há uma baixa produtividade,

devido ao longo tempo de reação requerido, e baixa estabilidade da enzima no meio reacional. Estes fatores podem ser amenizados com a imobilização de enzimas, que pode aumentar estabilidade da enzima no meio reacional, bem como reduzir o custo do processo através da sua reutilização em vários ciclos de reação.

3.3.3.1 Ésteres do biodiesel

Entre os principais ésteres que podem ser sintetizados por lipases está o biodiesel, que é um combustível composto de alquíésteres de ácidos graxos de cadeia longa, derivados de óleos vegetais ou de gorduras animais (BRASIL, 2008). Os ésteres alquílicos que compõem o biodiesel podem ser sintetizados por transesterificação, utilizando triacilgliceróis e álcoois, ou esterificação, utilizando ácidos graxos e álcoois. Na reação de transesterificação são produzidos diacilgliceróis e monoacilgliceróis como intermediários de reação, e glicerol como subproduto, enquanto que na esterificação ocorre com a formação de água como subproduto (FIGURA 10).

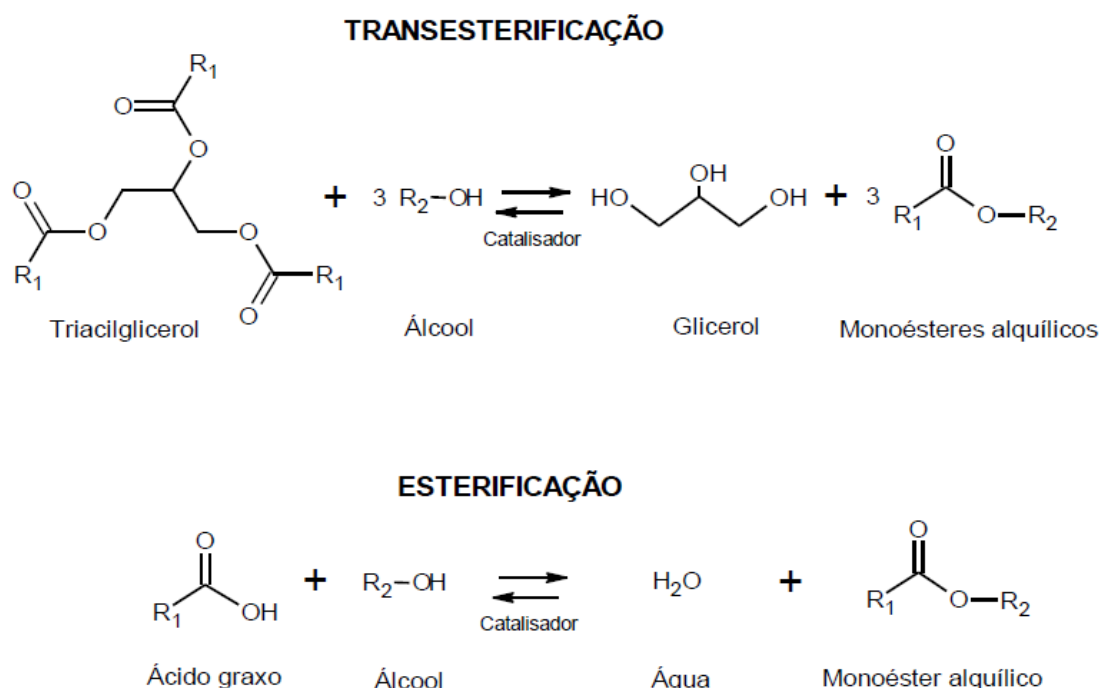


FIGURA 10 – SÍNTESE DE ÉSTERES DO BIODIESEL

Fonte: SOARES (2013).

Tipicamente, a produção industrial de biodiesel pela reação de transesterificação é catalisada por bases ou ácidos, mas conforme descrito anteriormente, estes catalisadores apresentam desvantagens. Assim, pesquisas sobre processos ambientalmente aceitáveis para a síntese de biodiesel são de grande interesse para indústria (VAN, 2005).

Processos biocatalíticos empregando lipases ganharam crescente interesse para a produção de biodiesel industrial, pois permitem a utilização de matérias-primas que contêm glicerídeos com alto teor de ácidos graxos livres, em condições operacionais brandas (SHIMADA et al., 2002). O desenvolvimento de processos enzimáticos para a produção de biodiesel tem como principais objetivos a redução do custo das lipases, diminuição do tempo de reação e a reutilização da enzima, o que beneficiaria a comercialização do processo biocatalítico.

Muitos trabalhos que utilizam lipases na síntese do biodiesel vêm sendo descritos na literatura e após otimização das reações, os objetivos citados acima estão sendo alcançados. Um exemplo é o trabalho de Raita et al. (2011) que utilizaram a lipase de *Thermomyces lanuginosa* imobilizada por ligação cruzada em uma matriz microcristalina. Os autores relataram a conversão de 87% do ácido palmítico e etanol em éster de biodiesel, após 6 h de reação e, a lipase ainda pôde ser reutilizada por 8 ciclos sem perda significativa da atividade. Neste caso, um dos fatores que podem ter contribuído para o alto rendimento em éster, sem desnaturação da enzima pelo etanol, foi a adição do *tert*-butanol como solvente no meio reacional. O *tert*-butanol é utilizado para aumentar a solubilidade do etanol ou metanol no meio reacional desviando sua ação desnaturante ou de inibição sobre a enzima (TAN, LU e NIE, 2010). Kim et al. (2013) relataram a conversão de 100% de biodiesel, em sistema livre de solvente, a partir do óleo de palma e metanol em apenas 10 h, utilizando como biocatalisador a lipase de *Staphylococcus haemolyticus* L62 imobilizada em uma resina acrílica por adsorção e posterior ligação cruzada com glutaraldeído. A mesma enzima pôde ser utilizada por 10 ciclos com perda de apenas 20% da atividade.

No entanto, muitas lipases, mesmo depois de imobilizadas, sofrem os efeitos negativos de álcoois de cadeia curta como o metanol e o etanol, que são geralmente utilizados na síntese do biodiesel (AL-ZUHAIR, LIG e JUN, 2007; YADAV e DEVI, 2004). Para tentar solucionar este problema, a adição do álcool em etapas é a estratégia mais comumente utilizada. Li, Chen e Tan (2011) verificaram que a síntese do éster oleato de etila, catalisada pela lipase de *Candida* sp. 99-125, aumentou de

57 para 70% em 6 h, após o etanol ter sido adicionado em 6 etapas. Em trabalhos anteriores, nosso grupo de pesquisa comprovou a eficiência do método de adição do etanol em etapas nas reações de síntese de ésteres do biodiesel. No estudo mais recente observou-se aumento de 18 para 80% na conversão durante a síntese do oleato de etila em *n*-heptano, após o etanol ter sido adicionado em 12 etapas, numa reação catalisada pela lipase recombinante de *Rhizopus oryzae* imobilizada em Accurel MP-1000 (MADALOZZO et al., 2014). Salum et al. (2010) verificaram um aumento na conversão de 77% em 70 h para 95% em 46 h na síntese do biodiesel por transesterificação entre óleo de soja e etanol, após o etanol ser adicionado em 2 etapas, utilizando como biocatalisador o sólido fermentado por *Burkholderia cepacia* LTEB11.

A indústria de biodiesel obtido via catálise química utiliza um processo bem estabelecido e baseia-se na transesterificação alcalina de óleos vegetais ou gorduras animais com álcoois de cadeia curta. Porém, os altos custos dos óleos vegetais em comparação ao óleo diesel, bem como a sua utilização como alimento, estimulam a busca por fontes economicamente mais acessíveis de matéria-prima, como por exemplo o óleo residual de fritura e resíduos industriais, como borras ácidas resultantes de processos de refino de óleos vegetais. Soares et al. (2013) utilizaram ácidos graxos obtidos por hidrólise em água subcrítica de matérias graxas de baixo custo e etanol como substrato na reação de esterificação para produção de biodiesel. Nesta reação, catalisada pelo sólido fermentado com atividade lipolítica de *Burkholderia cepacia* LTEB11, houve 92% de conversão em 31 h, em sistema livre de solvente. Este trabalho mostra que o processo de síntese dos ésteres de biodiesel por esterificação pode ser vantajoso, pois, além da possibilidade de utilização de resíduos como fonte de ácidos graxos, este processo pode fornecer conversões altas em tempos relativamente reduzidos de reação.

3.3.3.2 Ésteres de aromas

Ésteres de aromas são importantes matérias-primas utilizadas em alimentos, cosméticos e na indústria farmacêutica (BERGER, 2009). Os aromas considerados “naturais” são aqueles obtidos por extração direta a partir de fontes naturais, os quais

são produzidos em pequenas quantidades, e por isso são muito caros para uso comercial (SERRA, FUGANTI e BRENNAN, 2005). Porém, compostos de aromas e fragrâncias produzidos por via enzimática podem ser considerados “naturais” e podem, potencialmente, satisfazer as exigências da indústria alimentícia e cosmética (NOGALES et al., 2005).

A biocatálise é uma das alternativas para a síntese seletiva dos compostos desejados, em que as células microbianas ou as enzimas são utilizadas como catalisadores, no lugar da síntese química. A reação entre um álcool de cadeia curta e um ácido carboxílico de cadeia curta produz ésteres alifáticos, que são suficientemente pequenos para serem voláteis, capazes de produzirem notas frutadas agradáveis (GILLIES, YAMAZAKI e ARMSTRONG, 1987). Ésteres como butirato de etila, naturalmente presente em maçãs, pêras e morangos, têm muitas aplicações na indústria alimentar (MAHAPATRA et al., 2009). Ésteres produzidos a partir do ácido caprílico produzem aromas de damasco (caprilato de etila), gim (caprilato de propila), floral (caprilato de iso-butila), manteiga e ervas (caprilato de butila) e abacaxi (caprilato de iso-amila) (SUN et al., 2012).

A eficiência catalítica de lipases na síntese de ésteres de aromas tem sido relatada em muitos estudos recentemente, entretanto, muitos pesquisadores ainda realizam estas reações em meio contendo solventes orgânicos. Este é o caso de Mendes, Castro e Giordano (2014) que utilizaram a lipase de *T. lanuginosus* imobilizada em pérolas de glioxil-agarose na síntese do butirato de butila (aroma de abacaxi) em *n*-heptano. Neste caso, a conversão chegou a 85% em 24 h e a lipase manteve atividade mesmo após 5 ciclos de reação, com 80% de conversão após o 5º ciclo. Martins et al. (2014) também descreveram a síntese de ésteres de aromas em *n*-hexano. Os autores relataram o uso de três lipases diferentes para síntese de três diferentes ésteres: a lipase de *C. antarctica* imobilizada em resina macroporosa (Novozyme 435) na síntese do acetato de pentila (aroma de maçã e banana), a lipase de *T. lanuginosus* imobilizada em silicato (Lipozyme TL-IM) na síntese do butirato de pentila (aroma de damasco e pêra) e lipase de *R. mihei* imobilizada em resina de troca iônica (Lipozyme RM-IM) na síntese do butirato de etila (aroma de abacaxi e manga). Neste estudo, foi verificada uma conversão de 90% para todos os ésteres estudados, em menos de 6 h, mas a única lipase que pôde ser reutilizada por 10 ciclos, mantendo 80% de conversão, foi a Novozyme 435.

Em relação à síntese de ésteres de aromas em meio livre de solvente, um dos trabalhos mais recentes é o de Paludo et al. (2015), que realizaram a síntese do butirato de etila utilizando a lipase de Lipozyme TL-IM em banho de ultrassom, na presença de peneira molecular. Nestas condições, os autores relataram a conversão de 90% em éster em 6 h, sendo que, na ausência da peneira molecular, a conversão foi 30% menor. Os autores ainda verificaram que, em banho de ultrassom, a lipase pôde ser reutilizada por 10 vezes sem perda significativa da atividade, ao contrário de quando a reação foi submetida ao método de agitação normal, onde houve perda total da atividade lipolítica após o 4º ciclo.

Ainda há muito espaço para pesquisa quando o assunto é síntese de ésteres de aromas, principalmente no que diz respeito aos meios livres de solvente e na prospecção de novas lipases para serem empregadas nestes processos, visto que a maioria dos estudos relata reações em meio com solventes orgânicos com a utilização de lipases comerciais.

3.3.3.3 Lipídios estruturados

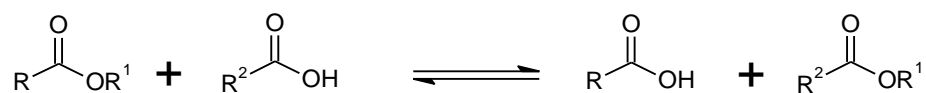
Os lipídios estruturados são definidos como triacilgliceróis reestruturados ou modificados com a finalidade de alterar a composição em ácidos graxos ou sua distribuição posicional na molécula de glicerol (AKOH e MOUSSATA, 1998). Podem ser produzidos a partir de triacilgliceróis de cadeias curta, média ou longa, de gorduras vegetais ou animais. Segundo LEE e AKOH (1998), a transesterificação ácida ou interesterificação (Esquema 2) são as reações utilizadas para síntese de lipídios estruturados para fins nutracêuticos.

A modificação de óleos e gorduras com composições específicas para aplicações funcionais e medicinais torna-se mais interessante quando se utilizam catalisadores enzimáticos. Quando são utilizados catalisadores químicos, a reação ocorre ao acaso e produz a completa redistribuição dos ácidos graxos nos triacilgliceróis, ou seja, a reação não tem especificidade e oferece pouco ou nenhum controle sobre a distribuição posicional dos ácidos graxos no produto final (WILLIS, LENCKI e MARANGONI, 1998). Já na catálise enzimática, que utiliza lipases *sn*-específicas, há um grande controle sobre a distribuição posicional dos ácidos graxos no produto, devido às características de regiosseletividade que as lipases utilizadas neste tipo de reação possuem (GUPTA, RATHI e BRADDOO, 2003).

Um dos principais objetivos da modificação de lipídios é facilitar a absorção intestinal e reduzir seu conteúdo calórico (JENNINGS e AKOH, 2001). Para esta finalidade, ácidos graxos de cadeia média são introduzidos nas posições *sn*-1 e 3 de um triacilglicerol em substituição a ácidos graxos de cadeia longa, pela ação de uma lipase *sn*-1,3 específica, que faz a modificação nas posições *sn*-1 e 3 sem alterar a posição *sn*-2. Entre os estudos que relatam a utilização de lipases *sn*-1,3 específica para esta finalidade pode-se citar o de Oh et al. (2009), que utilizaram o azeite de oliva e ácido cáprico para promover a reação de acidólise catalisada pela lipase Lipozyme TL IM, e obtiveram como produto um lipídio de baixa caloria. Jennings e Akoh (2001) utilizaram a lipase de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme IM 60) para catalisar a reação de incorporação do ácido cáprico no óleo de peixe. O principal objetivo dos autores foi obter um lipídio com ácidos graxos de cadeia média, de fácil absorção, nas posições *sn*-1 e 3 do triacilglicerol e o ácido graxo ω -3 na posição do *sn*-2 do triacilglicerol, obtendo-se um lipídio com duas qualidades nutracêuticas.

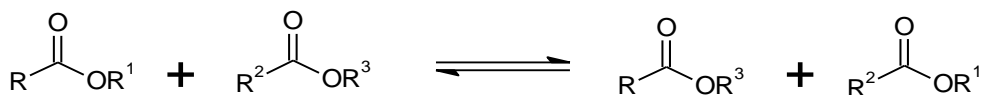
Outra aplicação para lipases *sn*-1,3 específica é a síntese do *sn*-1,3 diacilglicerol a partir do glicerol, que é raro na sua forma natural e tem propriedades importantes na indústria farmacêutica. Um exemplo é a síntese do fármaco ácido niflúmico (anti-inflamatório) que, quando esterificado na posição *sn*-2 do *sn*-1,3 diacilglicerol, forma um triacilglicerol que é melhor absorvido e tem menos efeitos colaterais que sua forma original (MENG et al., 2014).

Reação de Transesterificação - Acidólise



(Triacilglicerol) + (Ácido graxo) \rightleftharpoons (Lipídio Estruturado) + (Ácido graxo)

Reação de Interesterificação



(Triacilglicerol A) + (Triacilglicerol B) \rightleftharpoons (Lipídio Estruturado A) + (Lipídio Estruturado B)

ESQUEMA 1 – REAÇÕES DE SÍNTESE ENZIMÁTICA UTILIZADAS NA OBTENÇÃO DE LIPÍDIOS ESTRUTURADOS

Lipídios estruturados também podem ser sintetizados com o propósito de melhorar ou modificar características físicas (polimorfismo, ponto de fusão, conteúdo de gordura sólida, viscosidade e consistência) ou químicas (estabilidade oxidativa) dos triacilgliceróis. Este é o caso de margarinas e de gorduras utilizadas na fabricação de biscoitos, salgadinhos, molhos para salada e alimentos congelados. Existem muitos estudos de interesterificação enzimática para este fim e, geralmente, o seu principal objetivo é a produção de margarinas e misturas de lipídios com baixo teor de gorduras *trans* ou enriquecimento destes produtos com algum composto com propriedades nutracêuticas. Reshma et al. (2008) estudaram a reação de interesterificação entre estearina de palma e óleo de arroz utilizando a lipase Lipozyme TL IM para obtenção de um preparado de gorduras com teor zero de ácidos graxos *trans*. Goli, Sahri e Kadivar (2008) utilizaram a lipase de *Candida antarctica* (Novozymes 435) como biocatalisador na reação de incorporação do ácido linoléico conjugado (CLA) na estearina de palma para a possível produção de margarinas enriquecida com CLA, um isômero do ácido oleico com propriedades nutracêuticas, tais como inibição de crescimento de tumores, redução da aterosclerose e gordura corporal. Raseira et al. (2012) promoveram a reação de interesterificação entre estearina de palma, óleo de palmiste e um concentrado de triacilgliceróis rico em ácidos graxos ω -3 (EPAX AS), utilizando sólidos fermentados contendo lipase de *R. oryzae* e de *R. microsporus*. Neste caso, o objetivo foi a produção de margarina com alto teor de ácidos graxos ω -3.

Nos últimos anos, houve um aumento da demanda por parte de pesquisadores e indústrias por processos limpos e isso têm incentivado a pesquisa de processos alternativos à síntese química de ésteres. Assim, a utilização de enzimas como biocatalisadores se tornou alvo de pesquisa em várias aplicações. Pôde-se observar a partir desta revisão, que as mesmas lipases comerciais são utilizadas em vários processos há algum tempo. Portanto, a prospecção de novas enzimas e a otimização de sua atividade e estabilidade nos meios reacionais de síntese, através da imobilização, é de extrema importância para obtenção de biocatalisadores com propriedades melhores ou comparáveis às das lipases comerciais, aumentando a disponibilidade de alternativas vantajosas para auxiliar na implantação de processos biocatalisados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Auto Sustentável (NPDEAS), Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, ambos na Universidade Federal do Paraná, e no Laboratório de Tecnologia Enzimática do Departamento de Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá. O fluxograma da estratégia do trabalho está mostrado na Figura 11.

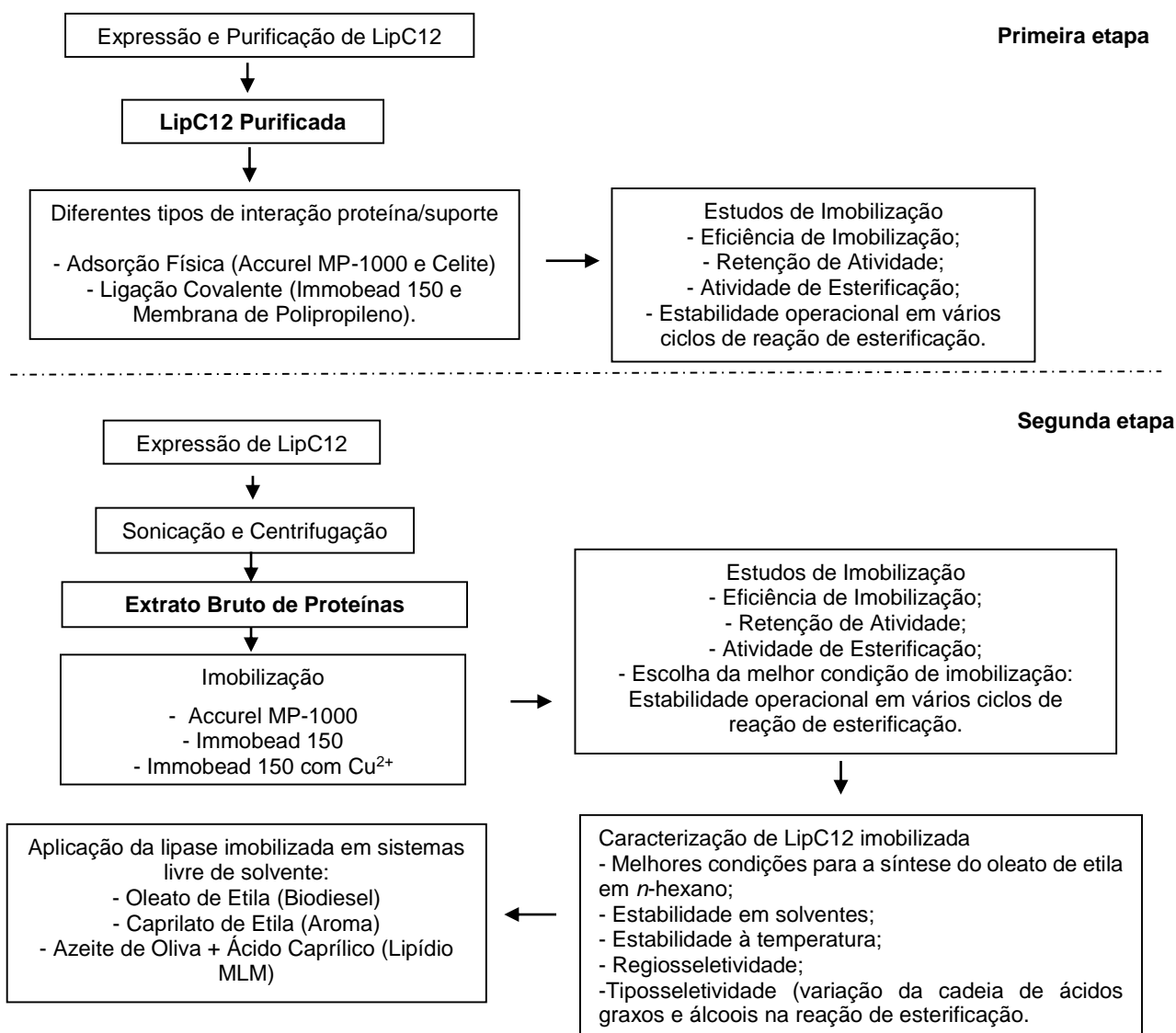


FIGURA 11 – FLUXOGRAMA DA ESTRATÉGIA DE TRABALHO

4.1 ESTUDOS DE IMOBILIZAÇÃO DE LIPC12 PURIFICADA

4.1.1 Superexpressão e purificação

Células de *Escherichia coli* BL21 (DE3) contendo o plasmídio pET28a-lipC12 foram cultivadas em 400 mL de meio LB a 37 °C até uma DO_{600} de 0,5 e induzidas pela adição de IPTG para uma concentração final de 0,5 mmol L⁻¹. Após indução, a cultura foi incubada por 16 h a 20 °C e as células foram coletadas por centrifugação (10 000 × *g* por 5 min) a 4 °C. O precipitado de células foi ressuspensão em 35 mL de tampão de lise (50 mmol L⁻¹ Tris-HCl pH 7,5, 500 mmol L⁻¹ de NaCl, 10 mmol L⁻¹ de imidazol, 10% (v/v) de glicerol, 10 mmol L⁻¹ de β-mercaptoetanol). Em seguida, as células foram lisadas por ultra-som em banho de gelo (12 ciclos de pulsos de 20 s, 90 W, com intervalos de 30 s) com um sonicador (SONICATOR® XL 2020, Heat systems-Ultrasonics Inc., New Highway, Farmingdale, NY, EUA). O extrato bruto (EB) foi então centrifugado (15 000 × *g* por 30 min) a 4 °C para sedimentar os restos celulares. O sobrenadante contendo a proteína com cauda His foi carregado em uma coluna HiTrap HP Chelating (GE Healthcare, EUA), previamente carregada com Ni²⁺, utilizando um sistema de cromatografia AKTAbasic (GE Healthcare, EUA). A coluna foi lavada com cinco volumes de tampão de lise e com cinco volumes de tampão de eluição (50 mmol L⁻¹ de Tris-HCl pH 7,5, 500 mmol L⁻¹ de NaCl, 1 mol L⁻¹ de imidazol, 10 mmol L⁻¹ de β-mercaptoetanol, 10% (v/v) de glicerol). A proteína foi eluída por um gradiente crescente de imidazol até 1 mol L⁻¹ no tampão de eluição, o que foi monitorado a um comprimento de onda de 280 nm. As frações com a proteína de interesse foram selecionadas por SDS-PAGE, agrupadas e dialisadas a 4 °C em tampão Tris-HCl (50 mmol L⁻¹ de Tris-HCl pH 7,5, 150 mmol L⁻¹ de NaCl, 5 mmol L⁻¹ de CaCl₂) para eliminar o imidazol.

A atividade de LipC12 purificada foi medida conforme item 4.6.3 e o teor de proteína do extrato purificado foi analisado conforme descrito no item 4.6.2.

4.1.2 Seleção dos suportes para a imobilização

A seleção do melhor suporte para imobilização foi realizada com LipC12 na forma purificada (4.1.1). Os suportes foram selecionados conforme os tipos de ligação/interação com a proteína, ou seja, ligação covalente, interação hidrofóbica e interação iônica. O objetivo desta etapa foi verificar qual o tipo de ligação/interação seria ideal para imobilizar LipC12, e assim, escolher o suporte adequado em termos de facilidade de imobilização, manutenção da atividade enzimática e possibilidade de reutilização da enzima imobilizada. Para tanto, foram utilizados os suportes Accurel MP-1000 (adsorção), Celite 545 (adsorção), Immobead 150 (ligação covalente), e uma membrana de polipropileno funcionalizada e ativada com glutaraldeído (ligação covalente) (BAYRAMOGLU et al., 2011). As características dos suportes utilizados estão apresentadas na Tabela 4.

TABELA 4 - SUPORTES UTILIZADOS PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPC12 E SUAS PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS

Suporte	Interação Proteína/Suporte	Composição	Procedência	Características
Accurel MP-1000	Adsorção	Polipropileno em forma de grânulos macroporosos	Akzo Nobel Fase Obernburg, Germany	Hidrofóbico Densidade: 1,993 g cm ³ Partícula: < 1500 µm Poro: 25 µm Área: 55,985 m ² g
Celite 545	Adsorção	Pó fino a base de SiO ₂	Synth Diadema/SP – Brasil	Hidrofílico Densidade: 300 g cm ³ Partícula: 20 a 100 µm
Membrana de Polipropileno	Ligação Covalente	- Polipropileno clorinado - Hexametileno Diamina - Glutaraldeído	Sigma-Aldrich, São Paulo/SP, Brasil	Hidrofóbico
Immobead 150	Ligação Covalente	Copolímero de metacrilato em forma de microesferas macroporosas	Sigma-Aldrich, São Paulo/SP, Brasil	Hidrofílico Grupo Funcional: Epóxido Partícula: 150 µm Poro: 15 nm Área: 250 m ² g ⁻¹

4.1.3 Procedimentos para imobilização

A lipase purificada (4.1.1) utilizada nos procedimentos de imobilização descritos a seguir continha 1329 U mg^{-1} (contra trioleína, em meio aquoso) e teor de proteína de 3 mg mL^{-1} .

4.1.3.1 Accurel MP-1000

A imobilização de LipC12 neste suporte foi realizada baseada no método proposto por Al-Duri e Yong (2000). A fim de excluir o ar contido dentro das partículas, o suporte (0,1 g) foi umedecido com solução de etanol (70% em água, v/v) por 30 min. Em seguida, o suporte foi lavado com água destilada, incubado em água destilada por 2 h e então, filtrado. O processo de imobilização foi feito em frascos Erlenmeyer com volume de 25 mL, onde foram colocados 5 mL da solução enzimática e 100 mg do suporte, com cargas de proteína entre 5 e 25 mg g^{-1} . Por carga de proteína entende-se a massa de proteína na solução enzimática (mg) por grama de suporte no início do processo de imobilização. A solução enzimática utilizada foi o extrato enzimático purificado diluído em tampão Tris-HCl (50 mmol L^{-1} de Tris-HCl pH 7,5, 150 mmol L^{-1} de NaCl, 5 mmol L^{-1} de CaCl_2). A mistura (suporte e solução enzimática) foi incubada a 4°C sob agitação orbital de 150 rpm por 24 h. Após este período, a enzima imobilizada foi removida por filtração a vácuo em papel de filtro qualitativo, seca em dessecador por cerca de 16 h a 4°C e armazenada na mesma temperatura (FIGURA 12). O tempo de imobilização foi determinado conforme a atividade residual tornou-se constante no sobrenadante, indicando saturação do suporte. O processo de imobilização foi seguido removendo-se alíquotas do sobrenadante em diferentes intervalos de tempo para determinação da atividade (Método titulométrico, 4.6.3).

LipC12 purificada imobilizada no suporte Accurel MP-1000 foi denominada Acc-LipC12.

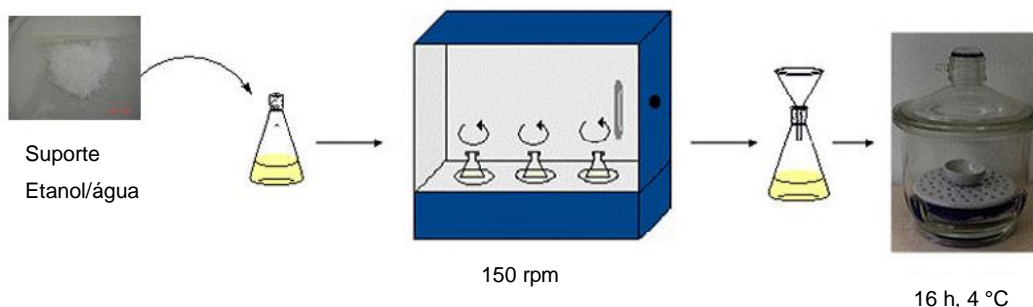


FIGURA 12 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DE LIPC12 EM ACCUREL MP-1000

4.1.3.2 Celite 545

A imobilização de LipC12 em Celite 545 foi feita com base na metodologia descrita por Kumar e Kanwar (2011). O suporte foi lavado 3 vezes com tampão Tris-HCl 50 mmol L⁻¹ pH 7,5 para remover as impurezas solúveis. Em seguida, 100 mg do suporte foram colocados em frascos Erlenmeyer de 25 mL com 5 mL de solução enzimática diluída no mesmo tampão, permanecendo por até 48 h a 4 °C sob agitação de 150 rpm. A carga de proteína utilizada foi de 10 mg g⁻¹. Após este período, o suporte foi removido e seco conforme descrito para o Accurel MP-1000 (FIGURA 9). O processo de imobilização foi acompanhado removendo-se alíquotas do sobrenadante em diferentes intervalos de tempo, para determinação dos teores de atividade (método titulométrico, 4.6.3). O tempo de imobilização foi determinado conforme a atividade residual tornou-se constante no sobrenadante.

LipC12 purificada imobilizada em Celite 545 foi denominada Cel-LipC12.

4.1.3.3 Membrana de polipropileno ativada com glutaraldeído

A preparação da membrana de polipropileno aminada foi realizada conforme relatado por Hong et al. (2009) (FIGURA 13). Primeiramente, o suporte polipropileno

clorinado (21 g) foi dissolvido em tolueno (280 mL). O reagente hexametilenodiamina (7 g) foi dissolvido em uma mistura de álcool isopropílico e acetona (1:1, v/v, 350 mL) e em seguida filtrado em papel de filtro contendo sulfato de magnésio anidro, para retirada da umidade. O suporte polipropileno clorinado diluído em tolueno (280 mL) foi misturado ao reagente hexametilenodiamina (350 mL) em um frasco de 1 L com tampa. A mistura permaneceu sob agitação orbital de 180 rpm durante 48 h a 50 °C. Após a reação, a membrana funcionalizada com grupamentos amino foi colocada em uma placa de Teflon, onde foi seca em temperatura ambiente durante 24 h. A membrana foi retirada da placa de Teflon lavada várias vezes com água deionizada, seca em estufa a 60 °C por 24 h e, em seguida, por mais 12 h a 105 °C.

Para a ativação dos grupos amino da membrana com glutaraldeído, o suporte foi recortado no tamanho de 1 cm² e 1 g foi transferido para frascos Erlenmeyer de 125 mL com soluções de glutaraldeído (25 mL), sob diferentes concentrações (0,5 a 2%, v/v). O pH das soluções foi ajustado para 7,0 com NaOH 0,1 mol L⁻¹. A mistura contendo membrana e glutaraldeído permaneceu sob agitação de 180 rpm a 25 °C por 12 h. Logo depois, as membranas ativadas foram removidas e lavadas 3 vezes com metanol, secas em dessecador por 6 h, e então armazenadas a 4 °C até o uso.

Para a imobilização, frascos Erlenmeyer de 25 mL contendo 5 mL da solução enzimática de LipC12, diluída em tampão Tris-HCl 50 mmol L⁻¹ pH 7,5 e a membrana foram submetidas a agitação de 150 rpm a 4 °C por até 48 h. A carga de proteína utilizada foi de 10 mg g⁻¹. O processo de imobilização foi acompanhado removendo-se alíquotas do sobrenadante em diferentes intervalos de tempo para determinação dos teores de atividade (Método titulométrico, 4.6.3). O tempo de imobilização foi determinado conforme a atividade residual tornou-se constante no sobrenadante. LipC12 purificada imobilizada em membrana de polipropileno foi denominada MP LipC12.

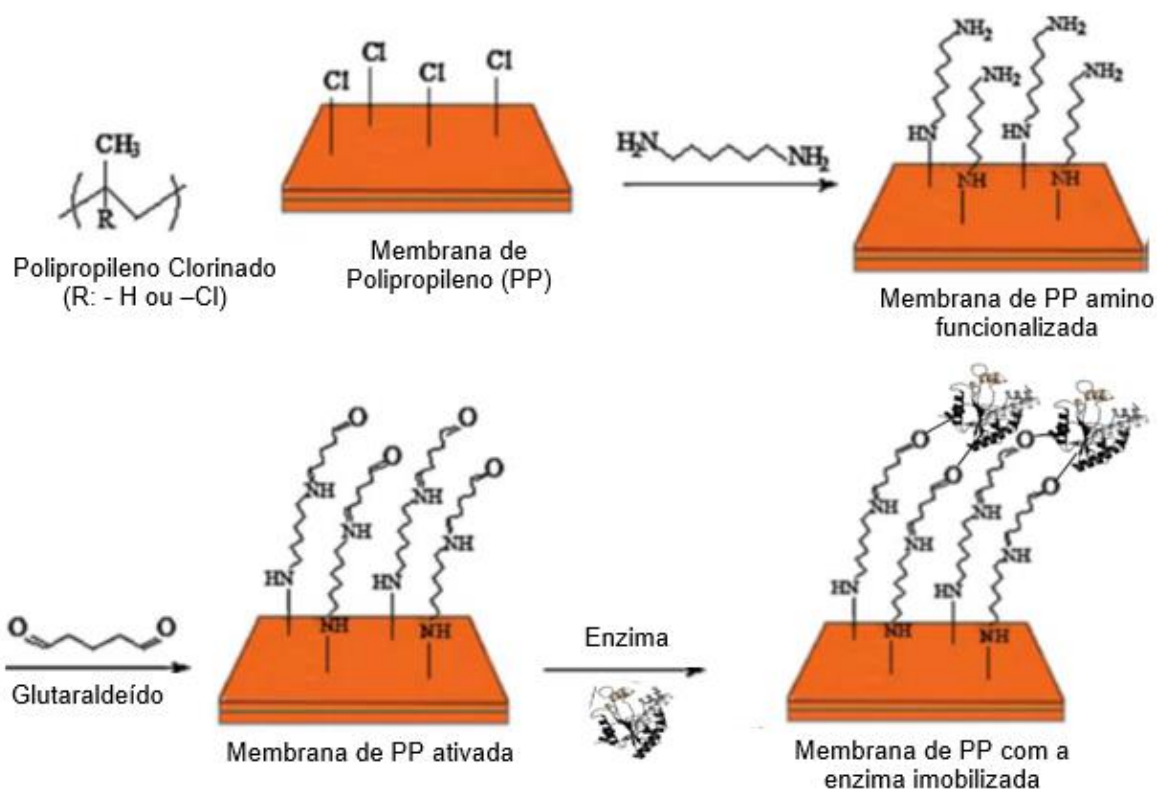


FIGURA 13 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA FUNCIONALIZAÇÃO E ATIVAÇÃO DA MEMBRANA DE POLIPROPILENO E IMOBILIZAÇÃO DE LIPC12

Adaptado de HONG et al. (2009).

4.1.3.4 Immobead 150

O processo de imobilização de LipC12 purificada em Immobead (TABELA 4) foi baseado na metodologia de Knezevic et al. (2006) (FIGURA 14). O suporte foi colocado em frascos Erlenmeyer de 25 mL com 5 mL de solução enzimática diluída em tampão Tris-HCl 50 mmol L⁻¹ pH 7,5, a 150 rpm e 4 °C. A carga de proteína utilizada foi 10 mg g⁻¹. O processo de imobilização foi seguido removendo-se alíquotas do sobrenadante nos tempos entre 0 e 6 h, para determinação da atividade (Método titulométrico, 4.6.3). O tempo de imobilização foi determinado conforme a atividade residual tornou-se constante no sobrenadante.

LipC12 purificada imobilizada em Immobead foi denominada lbead-LipC12.

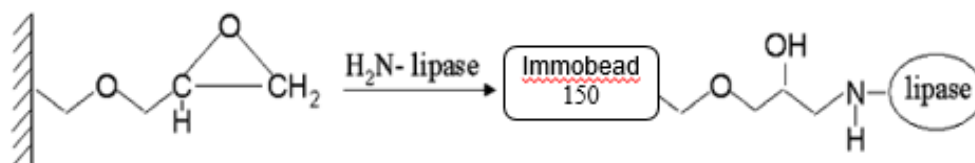


FIGURA 14 - REPRESENTAÇÃO DO MÉTODO DE IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES NO SUPORTE IMMOBEAD 150

Adaptado de KNEZEVIC et al. (2006).

4.1.4 Cinética de imobilização

Para todos os suportes estudados, a cinética de imobilização foi acompanhada pela medida de atividade residual no sobrenadante pelo método titulométrico em meio aquoso (4.6.3). Após filtração e secagem, a atividade da enzima imobilizada foi determinada através da reação de hidrólise da trioleína 65% (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) em meio orgânico (4.6.4), para prevenir a dessorção da enzima do suporte nos quais a imobilização ocorreu por adsorção.

A partir dos resultados experimentais foram calculados os parâmetros eficiência da imobilização (E) e a retenção de atividade (R), através das Equações 1 e 2, respectivamente (YADAV e JADHAV, 2005; BON et al., 1986).

Equação 1

$$E = \frac{(At_i - At_f) \times 100}{At_i}$$

Equação 2

$$R = \frac{A_o \times 100}{A_T}$$

Sendo:

A_{ti} : atividade inicial total de hidrólise em meio aquoso frente à trioleína no sobrenadante, antes da imobilização (U);

A_{tf} : atividade final total de hidrólise em meio aquoso frente à trioleína no sobrenadante após a imobilização (U);

A_o : Atividade de hidrólise do imobilizado ($U\ g^{-1}$) determinada em meio orgânico;

A_T : Atividade teórica do imobilizado em meio orgânico ($U\ g^{-1}$), calculada conforme a Equação 3:

Equação 3

$$A_T = (M_{PI} - M_{PF}) \times A_{ESPorg}$$

Sendo:

M_{PI} : massa de proteína (mg) originalmente da solução enzimática (sobrenadante) antes da imobilização;

M_{PF} : massa de proteína (mg) que permaneceu no sobrenadante ao final da imobilização;

A_{ESPorg} : atividade de hidrólise específica da enzima livre ($U\ mg^{-1}$ de proteína), medida em meio orgânico contra a trioleína.

4.2 IMOBILIZAÇÃO DE LIPC12 A PARTIR DO EXTRATO BRUTO

Os suportes que proporcionaram à lipase melhores resultados de atividade de hidrólise e de esterificação foram utilizados no estudo de imobilização de LipC12 a partir do extrato bruto (EB) de proteínas, sem a etapa de purificação.

Após a superexpressão de LipC12 em *E. coli* e lise das células por sonicação, o sobrenadante obtido a partir da centrifugação do EB (4.1.1) apresentou atividade de hidrólise contra trioleína de $1019\ U\ mg^{-1}$. Este sobrenadante foi chamado de EBLipC12 (extrato bruto de LipC12) e foi utilizado para imobilização nos suportes Accurel MP-1000 e Immobead 150.

4.2.1 Imobilização em Accurel MP-1000

O primeiro ensaio de imobilização foi realizado em frascos Erlenmeyer de 25 mL, utilizando-se 5 mL de EBLipC12 sem diluição (6 mg mL^{-1}) para cada 100 mg de suporte (carga de proteína de 300 mg g^{-1}) com tempo de contato de até 72 h. A cinética de imobilização foi avaliada conforme descrito no item 4.1.4.

Após imobilização, foi feito um estudo de dessorção de proteínas, seguido de determinação da atividade específica do extrato dessorvido, para verificar se havia imobilização seletiva de LipC12 no suporte. A dessorção da enzima foi feita por incubação de 50 mg do preparado imobilizado em frascos Erlenmeyer contendo 4 mL de uma solução de Triton X-100 0,2% (v/v) durante 1 h, em agitador orbital, a 150 rpm e 4°C (GUPTA et al., 2005). Em seguida, o sobrenadante foi coletado e a atividade de hidrólise em meio aquoso (4.6.3) e o teor de proteínas (4.6.2) foram avaliados.

Considerando que a carga de proteína de 300 mg g^{-1} foi muito elevada e não foram obtidos bons resultados em termos de eficiência de imobilização, cargas menores de proteína, entre 5 e 25 mg g^{-1} , foram utilizadas.

EBLipC12 imobilizado no suporte Accurel MP-1000 foi denominado Acc-EBLipC12.

4.2.2 Imobilização em Immobead 150

No estudo de imobilização de EBLipC12 no Immobead, o suporte foi utilizado na sua forma original e na forma ativada com íons cobre II. O processo de ativação do suporte seguiu a metodologia de Mateo et al. (2001), descrita abaixo.

A primeira etapa de ativação do Immobead teve como objetivo a introdução de grupos de ácido iminodiacético (IDA) no suporte, pois são estes grupos (IDA) que ligam os íons cobre. Para isso, 5 g do suporte foram adicionados a 9 mL de solução de borato de sódio ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e IDA (2 mol L^{-1}) a pH 8,5 e 25°C , sob agitação de 150 rpm durante 24 h. Após este período, o suporte foi lavado com água destilada, seco por filtração a vácuo e colocado em dessecador onde permaneceu por 16 h a 4°C , e em seguida foi armazenado na mesma temperatura.

Na segunda etapa, 5 g do suporte tratado como descrito acima foi colocado em 30 mL de água destilada contendo 1 g de CuSO_4 , onde permaneceu sob agitação de 150 rpm durante 2 h a 25 °C. Em seguida, o suporte foi lavado com água destilada, seco por filtração a vácuo e colocado em dessecador onde permaneceu por 16 h.

A imobilização foi realizada com cargas de proteína entre 100 e 400 mg g⁻¹, e para isso a solução de enzimas foi diluída em 10 mL tampão Tris-HCl a pH 7,5. A solução enzimática (8 mL) e o suporte (200 mg) permaneceram em frascos Erlenmeyer de 25 mL sob agitação de 150 rpm por até 6 h. A cinética de imobilização foi avaliada conforme descrito no item 4.1.4. Os preparados imobilizados foram recuperados por filtração com papel de filtro qualitativo (Whatman n° 1), colocados em dessecador a vácuo parcial durante 16 h a 4 °C e em seguida armazenados a -18 °C, para posterior avaliação em relação à atividade de esterificação (4.3.1).

A dessorção das proteínas imobilizadas por interação física no Immobead foi realizada para verificar quanto de proteína havia sido ligado covalentemente ao suporte. Para tanto, 20 mg da lipase imobilizada foram colocados em tubos Eppendorf (2 mL) contendo 2 mL de água destilada com 2% (m/v) de dodecilsulfato de sódio (SDS). Apoiados em estantes de borracha, os tubos permaneceram imersos em água a 100 °C por 30 min (MATEO et al., 2001). Com este tratamento, proteínas ligadas de forma não covalente ao suporte devem ser liberadas para o meio.

O perfil proteico do sobrenadante antes e após a imobilização, e da solução contendo as proteínas dessorvidas do suporte foi determinado pelo método do ácido bicinconínico (BCA) (4.6.2).

EBLipC12 imobilizado no Immobead ativado com Cu^{2+} foi denominado lbead Cu^{2+} -EBLipC12 e no Immobead sem ativar foi denominado lbead-EBLipC12.

4.2.2.1 Efeito de diferentes condições (pH e tempo de incubação) na imobilização de LipC12 em Immobead 150 a partir do extrato bruto

As condições de imobilização, quando suportes com grupos epóxido são utilizados, influenciam fortemente as propriedades da enzima imobilizada. De acordo com Mateo et al. (2000b), as ligações entre os grupos epóxido do suporte e os grupos nucleofílicos da proteína tornam-se mais fortes e mais numerosas com o aumento do

tempo de incubação e do pH da solução enzimática oferecida para imobilização. Nestas condições, as ligações covalentes multipontuais entre a enzima e o suporte são favorecidas.

Até esta etapa do trabalho, LipC12 contida no extrato bruto havia sido imobilizada no Immobead a pH 7,5 por até 6 h (4.2.2). Para avaliar se outras condições de imobilização de LipC12 no Immobead aumentariam sua atividade, principalmente em reações de síntese, ensaios foram feitos aumentando-se o tempo de incubação e os valores de pH da solução enzimática oferecida para imobilização. Para tanto, as condições estudadas foram:

- 1) Tempo de imobilização: 3 h pH: 8,5.
- 2) Tempo de imobilização: 6 h; pH: 8,5.
- 3) Tempo de imobilização: 24 h; pH: 8,5.
- 4) Tempo de imobilização: 24 h; pH: 8,5 + 24 h em tampão glicina 50 mmol L⁻¹ pH 10,0.
- 5) Tempo de imobilização: 24 h; pH: 8,5 + 24 h em solução de glicina 3 mol L⁻¹ pH 8,5.

Durante a imobilização em pH 7,5, o tampão Tris HCl 50 mmol L⁻¹ foi utilizado. Nestes ensaios, a carga proteína utilizada foi de 200 mg g⁻¹ e o extrato bruto (10 mL) e o suporte (200 mg) permaneceram em frascos Erlenmeyer de 25 mL sob agitação de 150 rpm por até 6 h. Os preparados imobilizados em todas as condições foram recuperados por filtração com papel de filtro qualitativo (Whatman nº 1), colocados em dessecador a vácuo parcial (300 mm/Hg) durante 16 h a 4 °C e em seguida armazenados a -18 °C, para posterior avaliação em relação à atividade de esterificação (4.3.1).

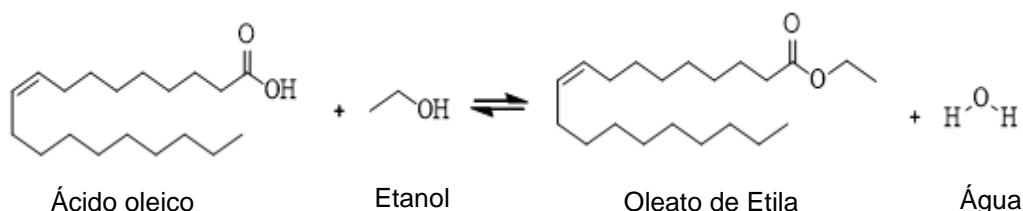
A dessorção das proteínas imobilizadas por interação física no Immobead foi novamente avaliada, conforme descrito em 4.2.2. O perfil proteico do sobrenadante, antes e após a imobilização, e da solução contendo as proteínas dessorvidas do suporte foram determinados pelo método do ácido bicinonínico (BCA) (4.6.2).

4.3 SÍNTESE DE ÉSTERES NA PRESENÇA DE *n*-HEXANO

A atividade de esterificação foi avaliada para LipC12 imobilizada em todos os suportes estudados tanto na forma purificada como na forma de EB de proteínas, e a reação padrão utilizada foi a síntese do oleato de etila.

4.3.1 Procedimento padrão para a reação de síntese do oleato de etila

A reação de síntese do oleato de etila (ESQUEMA 2) foi utilizada como reação padrão da síntese de ésteres, visto que as condições reacionais já foram otimizadas para outras lipases imobilizadas (MADALOZZO et al., 2014; SALUM et al., 2008; FERNANDES et al., 2007). O meio reacional (5 mL) foi composto de *n*-hexano, 70 mmol L⁻¹ de ácido oleico (Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil, 90% de pureza) e 210 mmol L⁻¹ de etanol (Synth, São Paulo, Brasil, 99,5% de pureza). A razão molar ácido oleico:etanol utilizada foi de 1:3. A reação teve início com a adição da enzima imobilizada (110 mg) e a mistura foi mantida em agitador orbital a 180 rpm e 40 °C. A reação foi acompanhada em diferentes intervalos de tempo pela retirada de alíquotas de 100 µL do meio reacional, que foram analisadas quanto ao teor de ácido graxo residual pelo método de Lowry e Tinsley (1976), como descrito no item 4.6.5. A conversão em éster foi calculada a partir do consumo de ácidos graxos do meio reacional.



ESQUEMA 2 - EQUAÇÃO GERAL DA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO

4.3.2 Reutilização de LipC12 imobilizada em reações de síntese do oleato de etila em *n*-hexano

O estudo de reutilização em vários ciclos de reação de esterificação foi realizado com os preparados imobilizados Acc-LipC12 (10 mg g⁻¹), Ibead-LipC12 (10 mg g⁻¹) e Ibead-EBLipC12 (200 mg g⁻¹). O procedimento padrão de síntese do oleato de etila em *n*-hexano (4.3.1) foi utilizado. O tempo de reação em cada ciclo foi de 7 h para Acc-LipC12; 4 h para Ibead-LipC12 e 1 h para Ibead-EBLipC12. Após cada ciclo, todos os preparados imobilizados foram lavados com 2 volumes de 5 mL de *n*-hexano durante a filtração a vácuo, recuperados e secos em dessecador a vácuo por 16 h a 4 °C. Após este período, os preparados imobilizados foram submetidos a um novo ciclo de reação. As conversões foram analisadas pelo método de Lowry-Tinsley (4.6.5) após cada ciclo de reutilização e expressas em percentual da conversão absoluta obtida em cada ciclo.

4.3.3 Efeito dos principais parâmetros de reação na síntese do oleato de etila em *n*-hexano

A velocidade inicial da reação de síntese do oleato de etila foi utilizada para medida da atividade de esterificação de todos os derivados imobilizados, mas o estudo dos principais parâmetros de reação, descritos abaixo, foi realizado apenas com Ibead-EBLipC12, tendo em vista os melhores resultados apresentados em comparação com os outros imobilizados de LipC12.

4.3.3.1 Quantidade de enzima

O efeito da quantidade de Ibead-EBLipC12 na conversão em éster foi estudado através da adição de 20, 50, 80 e 110 mg de enzima imobilizada no meio da reação

de síntese do oleato de etila (4.3.1). Estas massas representam 18, 45, 72 e 100%, respectivamente, em relação à massa de ácido oleico adicionada ao meio reacional.

4.3.3.2 Temperatura

O efeito da temperatura nas conversões em éster utilizando Ibead-EBLipC12 foi avaliado na síntese do oleato de etila utilizando a massa de Ibead-EBLipC12 encontrado em 4.3.3.1, variando-se as temperaturas entre 30 e 60 °C sob agitação de 180 rpm.

4.3.3.3 Agitação

Com base em estudos anteriores (MADALOZZO et al., 2014; BARON et al., 2011; SALUM et al., 2008), a agitação de 180 rpm estava sendo utilizada na reação de esterificação (4.3.1); mas para verificar se um aumento na agitação proporcionaria maiores conversões em éster, a reação de síntese do oleato de etila também foi realizada sob agitações de 250 e 300 rpm, nas melhores condições encontradas em 4.3.3.1 e 4.3.3.2.

4.3.4 Efeito de diferentes substratos na atividade de esterificação de LipC12 imobilizada em Immobead 150 a partir do extrato bruto

Após determinar os valores de temperatura, agitação e quantidade de lipase ótimos para a reação de esterificação em meio orgânico (4.3.3), a atividade de Ibead-EBLipC12 e as conversões em éster, determinadas pelo método de Lowry-Tinsley (4.6.5), foram avaliadas frente a diferentes ácidos graxos e álcoois. Foram utilizados ácidos graxos livres (AGLs) de grau analítico com diferentes tamanhos de cadeia e graus de saturação: oleico (C18:1) (90%), palmítico (C16:0) (99%), mirístico (C14:0)

(99%) e caprílico (C 8:0) (99%), todos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA), e linoleico (C18:2) (90%), esteárico (C18:0) (99%) e láurico (C 12:0) (98%), da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Os álcoois utilizados foram: metanol (99,5%), etanol (99,5%), propanol (P.A) e butanol (P.A) (Synth, São Paulo, Brasil).

4.4 CARACTERIZAÇÃO DE LIPC12 IMOBILIZADA EM IMMOBEAD A PARTIR DO EXTRATO BRUTO

A caracterização de lbead-EBLipC12 foi realizada através da reação de síntese do oleato de etila em meio orgânico, após otimização da reação, conforme descrito em 4.3.3.

4.4.1 Estabilidade ao armazenamento

A atividade de esterificação de lbead-EBLipC12 foi avaliada a cada 30 dias durante 6 meses para verificar sua estabilidade durante armazenamento a -18 °C. A lipase imobilizada (1,5 g) ficou armazenada em um tubo tipo Falcon de 50 mL com tampa, o qual também foi vedado com uma película flexível de ação aderente (Parafilm). Alíquotas de 240 mg foram retiradas mensalmente para medida da atividade de esterificação, que foi expressa em percentual de atividade residual relativo ao primeiro dia de armazenamento.

4.4.2 Estabilidade em solventes e à temperatura

A estabilidade de lbead-EBLipC12 em diferentes solventes orgânicos foi estudada através da medida da atividade de esterificação após incubação por até 24 h nos solventes hidrofóbicos iso-octano, *n*-heptano, *n*-hexano e tolueno, e nos solventes hidrofílicos butanol, propanol, iso-propanol, etanol e metanol. A lipase

imobilizada (80 mg) foi colocada em frascos Erlenmeyer de 25 mL com 3 mL de cada solvente, os quais foram submetidos à agitação orbital de 250 rpm a 40 °C (mesmas condições da reação de esterificação). Amostras da lipase foram retiradas após 1, 12 e 24 h para a medida da atividade de esterificação.

A estabilidade à temperatura foi avaliada colocando-se 80 mg da enzima imobilizada em frascos Erlenmeyer de 25 mL com 3 mL de *n*-hexano a 250 rpm em temperaturas entre 30 e 60 °C. Amostras foram retiradas do meio após 1, 12 e 24 h de incubação para medida de atividade de esterificação.

4.4.3 Regioespecificidade

A regioespecificidade ou especificidade posicional de Ibead-EBLipC12 foi determinada pela avaliação dos produtos de hidrólise da trioleína pura (99%) em meio orgânico obtidos após 5 min de reação. O meio reacional foi composto de 5 mL de *n*-hexano, 20 mmol L⁻¹ de trioleína, 0,1 mL (2%, v/v) de água destilada. A reação foi iniciada pela adição de 20 mg da enzima imobilizada. A mistura foi mantida em agitador orbital a 200 rpm e 40 °C durante 5 min. Os produtos da reação foram analisados por cromatografia em camada delgada (CCD) (4.6.6) e foram comparados com os padrões 1 (2)-monoleína, 1,2 (2,3)-dioleína, 1,3-dioleína, trioleína e ácido oleico (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) (SUGIHARA et al., 1992).

4.5 DESENVOLVIMENTO DE APLICAÇÕES PARA IBEAD-EBLipC12

Ibead-EBLipC12 (200 mg g⁻¹) foi utilizada em reações de síntese de ésteres em sistemas livres de solvente, para diferentes finalidades. As reações estudadas foram a síntese do oleato de etila (biodiesel), a síntese do caprilato de etila (aroma) e a síntese de um lipídio nutracêutico obtido através da reação transesterificação ácida (acidólise) do azeite de oliva.

4.5.1 Éster do biodiesel - Oleato de etila

A síntese do oleato de etila foi realizada de duas formas: com a adição direta do etanol no início da reação e com a adição do etanol em etapas. Cada reação foi realizada utilizando-se 4 mL de meio reacional em frascos Erlenmeyer de 25 mL, os quais foram incubados a 40 °C e 300 rpm. O conteúdo em éster foi determinado por cromatografia em fase gasosa (4.6.7). Na primeira reação, a mistura reacional inicial foi composta de 10,6 mmol de ácido oleico (3 g) e 10,6 mmol de etanol (0,49 g) e a reação foi iniciada com a adição de 600 mg de Ibead-EBLipC12. Na segunda reação, 600 mg de Ibead-EBLipC12 foram adicionados em 10,6 mmol de ácido oleico e a reação foi iniciada com a adição de 1,77 mmol de etanol, e mais 5 alíquotas adicionais de 1,77 mmol de etanol adicionadas em intervalos por até 24 h, totalizando 10,6 mmol.

4.5.2 Éster de aroma - Caprilato de etila

A síntese do caprilato de etila também foi realizada com a adição direta do etanol no início da reação e com a adição do etanol em etapas. Cada reação foi realizada utilizando 3 mL de meio reacional em frascos Erlenmeyer de 25 mL, os quais foram incubados a 40 °C e 300 rpm. O conteúdo em éster foi determinado por cromatografia em fase gasosa (4.6.7). Na primeira reação, a mistura reacional inicial foi composta de 13,9 mmol de ácido caprílico (2 g) e 13,9 mmol de etanol (0,639 g) e a reação foi iniciada com a adição de 400 mg de Ibead-EBLipC12. Na segunda reação, 400 mg de Ibead-LipC12 foram adicionados em 13,9 mmol de ácido caprílico e a reação foi iniciada com a adição de 2,31 mmol de etanol e mais 5 alíquotas de 2,31 mmol de etanol adicionadas em intervalos por até 24 h, totalizando 13,9 mmol de etanol ao final da reação.

4.5.3 Síntese de um lipídio estruturado

A síntese de um lipídio estruturado foi realizada através da transesterificação ácida (acidólise) do azeite de oliva com ácido caprílico. A mistura reacional consistiu de 3,4 mmol de azeite de oliva (3 g) e 6,77 mmol de ácido caprílico (0,98 g), correspondendo a uma razão molar azeite de oliva:ácido caprílico de 1:2. Esta razão molar corresponde ao valor estequiométrico necessário para a inserção do ácido graxo nas posições *sn*-1 e *sn*-3 do triacilglicerol. A reação foi iniciada com a adição de 600 mg de Ibead-EBLipC12 (15% em relação à massa total de substratos) no meio reacional em frascos Erlenmeyer de 25 mL, os quais foram incubados a 40 °C e 300 rpm durante 72 h.

Os produtos da reação foram avaliados por cromatografia gasosa conforme descrito em 4.6.7.2.

4.6 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.6.1 Eletroforese SDS-PAGE

A eletroforese desnaturante de proteínas (SDS-PAGE) foi feita em gel de poliacrilamida segundo Laemmli (1970), usando o gel de empilhamento com 5% de poliacrilamida (m/v) e o gel de separação com 12% de poliacrilamida (m/v). As amostras foram aquecidas a 100 °C por 5 min e submetidas à eletroforese, aplicando-se 10 µL de amostra. As proteínas foram coradas com azul brilhante de Coomassie R-250 0,05% (m/v) e descoradas com uma mistura de metanol: ácido acético: água (5/1/4, v/v/v). Os marcadores de massa molecular utilizados foram: fosforilase b (97 kDa), BSA (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (31 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactolbumina (14,4 kDa) (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EUA). As eletroforeses foram realizadas sob voltagem constante de 150 V.

4.6.2 Determinação de proteínas

A concentração de proteínas do extrato enzimático purificado e não-purificado foi determinada através do método de Smith et al. (1985) ou método do ácido bicinconínico (BCA), utilizando o kit “Pierce BCA Protein Assay” (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EUA), com albumina sérica bovina (BSA) (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) como padrão.

4.6.3 Determinação da atividade de hidrólise em meio aquoso pelo método titulométrico (pH-Stat)

Esta metodologia proposta por Stuer, Jaeger e Winkler (1986), baseia-se na titulação com NaOH dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima a partir dos triacilgliceróis. A enzima (livre ou imobilizada) é colocada em um recipiente contendo o substrato emulsificado, com agitação e temperatura controlada. As emulsões são preparadas através da mistura de água destilada, Tris-HCl (2,5 mmol L⁻¹, pH 7,0), CaCl₂ (2 mmol L⁻¹), NaCl (150 mmol L⁻¹), goma arábica (3%, m/v) e 67 mmol L⁻¹ de substrato (tributirina, tricaprilina ou trioleína) (TISS, CARRIERE e VERGER, 2001). Em seguida, a mistura é emulsionada em um liquidificador Arno Optimix (Arno, São Paulo, Brasil) por 5 min. Para cada ensaio, 20 mL de emulsão foram adicionados ao vaso de reação termostatizado, com agitação magnética.

A atividade de lipase é medida através da quantidade de NaOH (0,05 mol L⁻¹) adicionada pelo titulador automático pH-Stat (Metrohm 718, Herisau, Suíça) para titular os ácidos graxos liberados durante a reação de hidrólise. O pH dos ensaios foi mantido em 7,5 e a reação, realizada a 30 °C, foi acompanhada durante 5 min. A atividade de hidrólise foi calculada de acordo com a Equação 4.

Equação 4

$$A = \frac{dV}{dt} \times [\text{NaOH}] \times f \times F_{\text{pH}}$$

Sendo:

dV/dt : velocidade inicial da reação, calculada pelo consumo de NaOH na titulação, em mL min^{-1} ;

$[\text{NaOH}]$: concentração de NaOH em $\mu\text{mol mL}^{-1}$;

f : fator de correção da concentração de NaOH;

F_{pH} : fator de correção (adimensional) relacionado à dissociação parcial dos ácidos graxos da tributirina, tricaprilina e trioleína, que possuem valor de pK_a de 4,57, 4,89 e 6,8, respectivamente.

Para cada substrato, F_{pH} foi calculado de acordo com a Equação 5, considerando o pH do ensaio (7,5).

Equação 5

$$F_{\text{pH}} = \frac{1 + 10^{(\text{pH}-\text{pK}_a)}}{10^{(\text{pH}-\text{pK}_a)}}$$

A atividade lipolítica foi expressa como unidades de atividade por miligrama de proteína (U mg^{-1}) ou unidades de atividade por grama de suporte (U g^{-1}), sendo, uma unidade de atividade (U) a quantidade de enzima que promove a liberação de $1 \mu\text{mol}$ de ácido graxo por min, nas condições utilizadas no ensaio.

4.6.4 Determinação da atividade de hidrólise em meio orgânico

O procedimento de hidrólise em meio orgânico foi adaptado do método proposto por Gonçalves (1999). A reação foi realizada em frascos Erlenmeyer de 25 mL e o meio reacional composto de 4,6 mL de *n*-hexano, 70 mmol L^{-1} de trioleína (65%), 2% (v/v) de água destilada ($100 \mu\text{L}$) e 20 mg da lipase imobilizada. Quando a atividade da lipase livre foi medida, ao invés da adição de 2% de água destilada ($100 \mu\text{L}$), foram adicionados $100 \mu\text{L}$ da enzima diluída em tampão (Tris HCl 50 mmol L^{-1} pH 7,5). A mistura foi mantida em agitador orbital a 180 rpm a 40°C e a reação foi acompanhada por até 25 min pela retirada de alíquotas de $100 \mu\text{L}$ do meio reacional para dosagem de ácidos graxos livres pelo método de Lowry e Tinsley (1976) (4.6.5).

Uma unidade de atividade (U) é a quantidade de enzima que promove a liberação de 1 μmol de ácido graxo por min, nas condições utilizadas no ensaio.

4.6.5 Determinação dos ácidos graxos livres por método colorimétrico (Lowry-Tinsley)

O método de Lowry e Tinsley (1976) foi utilizado para quantificar o teor residual de ácidos graxos (ácido oleico e demais ácidos graxos utilizados) durante as reações de síntese de ésteres e de hidrólise da trioleína em meio orgânico. A partir destes dados, foi possível calcular o rendimento em éster, atividade de esterificação e atividade de hidrólise. Este método mede a coloração do complexo azul-esverdeado (715 nm) formado entre os íons Cu^{2+} e os ácidos graxos livres solúveis em fase orgânica. A concentração de ácido graxo no meio foi calculada por curvas de calibração feitas com os ácidos graxos utilizados neste trabalho (na faixa de 5 e 160 mmol), que foi obtida nas mesmas condições do ensaio. Os ácidos graxos utilizados foram: oleico (C18:1) (90%), palmítico (C16:0) (99%), mirístico (C14:0) (99%) e caprílico (C 8:0) (99%), linoleico (C18:2) (90%), esteárico (C18:0) (99%) e láurico (C 12:0) (98%).

Para cada ensaio, foram adicionados 100 μL da amostra a ser analisada em tubos Eppendorf contendo 1150 μL de tolueno e 250 μL do reativo de cor, que consistiu em uma solução aquosa de acetato de cobre II (5%, m/v), com pH (6,0-6,2) corrigido previamente com piridina. A mistura foi agitada em vórtex (agitador de tubos) durante 40 s. Em seguida, a fase orgânica foi removida com pipeta Pasteur e sua absorbância foi medida em a 715 nm em espectrofotômetro modelo UV-1800 (Shimadzu, Kyoto, Japão).

4.6.6 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A cromatografia em camada delgada foi utilizada para avaliar a regiosseletividade da lipase imobilizada (4.4.3) e também verificar separação dos

compostos não-polares presentes no triacilglicerol após etapas de desacidificação e separação em fase sólida (sílica) durante a síntese de um lipídio estruturado (4.5.3).

Durante a avaliação da regiosetividade da lipase, alíquotas de 2 µL do produto da reação de hidrólise e dos padrões 1 (2)-monoleína, 1,2 (2,3)-dioleína, 1,3-dioleína, trioleína e ácido oleico (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) foram diluídas em *n*-hexano e aplicadas na placa de Sílica Gel 60 (Merck KgaA, Darmstadt, Germany). Uma mistura de clorofórmio, acetona e ácido acético numa proporção de 95:4:1 (v/v/v) foi utilizada para corrida da amostra na placa (DHEEMAN, HENEHAN e FRÍAS, 2011).

Para análise dos triacilgliceróis isolados nas etapas descritas em 4.6.7.2, que representam o azeite de oliva antes e depois da reação de transesterificação, os solventes utilizados para a corrida da amostra na cromatoplaça foram éter de petróleo (Química Moderna, São Paulo, Brasil), dietil éter (Ecibra, São Paulo, Brasil) e ácido acético (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) numa proporção de 80:20:0,5 (v/v/v) (CARRÍN e CAPRISTE, 2008).

Em ambas análises, o desenvolvimento das bandas foi verificado utilizando uma câmara saturada com iodo gasoso.

4.6.7 Cromatografia em fase gasosa

O método de cromatografia em fase gasosa foi utilizado para análise dos etil-ésteres formados nas reações de esterificação em meios livres de solventes e também para a análise do perfil em ácidos graxos do lipídio estruturado sintetizado a partir de transesterificação ácida do azeite de oliva.

Utilizou-se um cromatógrafo em fase gasosa, modelo GC-2010 (Shimadzu Co, Quioto, Japão), equipado com detector de ionização de chama (DIC) e coluna capilar Rtx®-Wax (Restek, Bellefonte, Pensilvânia, EUA) com 0,32 mm de diâmetro interno, 30 m de comprimento e 0,25 µm de filme líquido. As temperaturas do injetor e detector foram ajustadas para 250 °C. Foi injetado 1 µL de amostra com razão de *splitting* de 1:50, utilizando nitrogênio como gás de arraste. Os cromatogramas foram registrados e analisados com um software da Shimadzu GC Solution (versão 2.3).

4.6.7.1 Quantificação dos etil-ésteres provenientes das reações de esterificação em sistemas livres de solvente

A quantificação dos ésteres etílicos formados a partir das reações de esterificação (4.5.1 e 4.5.2) foi feita por padronização interna com o padrão heptadecanoato de metila (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). As amostras coletadas em diferentes tempos de reação foram lavadas três vezes com 1 mL de solução saturada de NaCl para retirada do excesso de etanol. Após lavagem, sulfato de sódio anidro (Synth, São Paulo, Brasil) foi colocado na fração orgânica (contendo os ésteres) para a retirada de umidade. Cinquenta miligramas da amostra lavada e seca foram dissolvidos em 1 mL de *n*-heptano com 10% do padrão interno heptadecanoato de metila.

A programação do aquecimento da coluna foi feita da seguinte forma: 120 °C por 2 min, aumento da temperatura para 180 °C a 10 °C por min, a qual foi mantida por 3 min e aquecimento até 230 °C a 5 °C por min, que foi mantido por 15 min. O teor de éster foi calculado somando-se as áreas dos picos dos ésteres e do padrão interno C17 e relacionando-as com a área do pico do padrão interno C17, de acordo com a Equação 6. Os resultados foram expressos em percentual (%) de éster.

Equação 6

$$X = \frac{\sum A - A_{PI}}{A_{PI}} \times \frac{C_{PI} \times V_{PI}}{m} \times 100$$

Sendo:

X = conversão em éster

ΣA = soma das áreas dos picos

A_{PI} = área do padrão interno (C17)

C_{PI} = concentração em mg mL⁻¹ de heptadecanoato de metila

V_{PI} = volume em mL do padrão interno (C17)

m = massa em mg da amostra

4.6.7.2 Determinação do perfil de ácidos graxos do triacilglicerol antes e depois da reação de transesterificação ácida (acidólise)

O perfil em ácidos graxos do azeite de oliva antes e depois da reação de acidólise foi avaliado através da identificação dos etil-ésteres das amostras, por cromatografia em fase gasosa.

Antes da análise, a fração correspondente ao triacilglicerol no início e final da reação foi isolada em duas etapas: desacidificação, para extração dos ácidos graxos e separação em coluna de sílica, para extração dos monoacilgliceróis e diacilgliceróis. A desacidificação foi feita por extração alcalina conforme Carrín e Capriste (2008). O produto da reação (400 mg) foi misturado com *n*-hexano (6 mL), solução de fenolftaleína, e 3,2 mL de KOH 0,5 mol L⁻¹ em etanol 20% (v/v) (**solução 1**). Após agitação, a fase orgânica foi coletada e lavada com *n*-hexano (2 mL). A fase hexânica foi coletada e misturada novamente com a **solução 1** e 2,4 mL de solução de NaCl saturada. Após agitação, a fase hexânica foi coletada e o *n*-hexano evaporado em estufa a 60 °C para obter o produto desacidificado.

O produto desacidificado foi dissolvido em éter de petróleo numa concentração de 25 mg mL⁻¹ e em seguida eluído através de uma coluna de separação de fase sólida com um volume de 3 mL preenchida com sílica gel (500 mg/3 mL) (Applied Separations, Pensilvânia, EUA), utilizando 15 mL de éter de petróleo e dietil éter (90:10, v/v), para obtenção dos compostos não-polares. A separação do triacilglicerol dos demais componentes da amostra foi verificada por CCD (FIGURA 15). Em seguida, o solvente foi evaporado e as amostras foram submetidas a uma transesterificação química para posterior análise, como descrito abaixo.

Os produtos e reagentes da reação de acidólise foram analisados por CG (4.6.7). Para tanto, os triacilgliceróis foram submetidos a transesterificação a frio com KOH etanólico baseado no método Ce 2-66 da AOCS (1997). A fração correspondente aos triacilgliceróis (após etapas de desacidificação e separação em fase sólida) foi dissolvida em 2 mL de *n*-hexano e 0,2 mL de KOH 2 mol L⁻¹ em etanol 95% (v/v). Esta mistura foi agitada em vórtex por 30 min à temperatura ambiente e posteriormente analisada por CG.

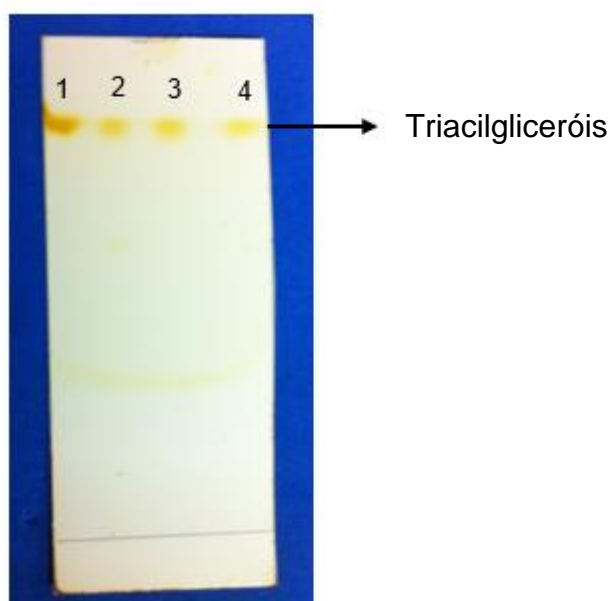


FIGURA 15 - PLACA DE CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA IDENTIFICANDO A BANDA CORRESPONDENTE AO TRIACILGLICEROL APÓS ETAPAS DE EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS, MONOACILGLICERÓIS E DIACILGLICERÓIS

Legenda: 1 – Azeite de Oliva; 2 a 4 – Azeite de oliva após transesterificação com ácido caprílico.

Padrões dos ácidos graxos (AGL) caprílico, palmítico, linoleico e esteárico foram esterificados para comparação com aqueles presentes nas amostras de triacilgliceróis. Para isso, 100 mg do AGL foram misturados com 5 mL de solução etanólica de H_2SO_4 (75 mmol L^{-1}). A mistura foi mantida por 10 min em um banho de água a 80°C , sob agitação magnética. Após o frasco ser retirado do banho e resfriado, 5 mL de *n*-heptano foram adicionados e o frasco foi agitado manualmente e mantido a 60°C por 5 min. Posteriormente, os padrões foram analisados por CG.

A identificação dos ácidos graxos foi realizada por comparação dos tempos de retenção dos picos da amostra com os picos de uma mistura padrão de metil-ésteres Mix FAME37 (Supelco®, Bellefonte, Pensilvânia, EUA) e também por comparação com os padrões de ácidos graxos esterificados conforme descrito acima. A quantificação foi feita por normalização das áreas obtidas por integração dos picos identificados nos cromatogramas, utilizando a Equação 7.

Equação 7

$$\text{AGL (\%)} = \frac{A_i \times 100}{\sum A}$$

Sendo:

AGL: Ácidos Graxos Livres

A_i: área de cada pico de etil-éster

ΣA: somatório de todas as áreas dos picos de etil-ésteres.

A programação de aquecimento da coluna foi a mesma descrita em 4.6.7.1.

4.6.7.3 Análise posicional dos ácidos graxos presentes no lipídio estruturado

Para identificação dos ácidos graxos esterificados na posição *sn*-2 do lipídio estruturado, foi realizada uma hidrólise em meio orgânico (4.6.4) catalisada pela lipase recombinante de *Rhizopus oryzae* (ROL), que já foi identificada como *sn*-1,3 específica (NUNES et al., 2011). Após 5 min de reação, o produto foi analisado por CCD. Amostras de 150 µL foram aplicadas sobre placas de sílica preparativa (20 × 10 cm, Sílica gel F254, 0,25 mm de espessura, Merck, Darmstadt, Germany) e desenvolvidas em fase móvel composta de *n*-hexano/éter etílico/ácido acético (70:30:1,5, v/v/v). As placas foram visualizadas em câmara UV a 366 nm, utilizando 2,7-diclorofluoresceína (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA), como revelador. A banda correspondente ao monoacilglicerol foi coletada e esterificada (4.6.7.2) para análise por GC (4.6.7).

4.7 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DAS AMOSTRAS

Os valores apresentados nos gráficos e tabelas deste trabalho correspondem às médias dos resultados, em duplicata ou triplicata, seguidas do desvio padrão da média, calculado pela Equação 8.

Equação 8

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

onde: s é o desvio padrão da média; x_i é o valor de cada resultado individual (x_1 , x_2 , x_3); \bar{x} é a média aritmética dos valores x_i e n é o número de amostras.

Para comparar os resultados, foi aplicado o teste t , com o auxílio das ferramentas de análise do Excel, com nível de significância de 5%. Assim, um valor de $p > 0,05$ significa que não houve diferença estatisticamente significativa entre a média dos resultados e $p < 0,05$ significa que houve diferença estatisticamente significativa entre a média comparadas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA LIPASE LipC12

As células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas com o plasmídeo pET28a-lipC12, foram induzidas com IPTG e o extrato proteico foi analisado por SDS-PAGE. O teste de expressão confirmou que a proteína LipC12 com cauda His foi devidamente expressa (FIGURA 16). A proteína recombinante tem massa molecular de 33,4 kDa e se encontra majoritariamente na fração solúvel (GLOGAUER et al. 2011). Sendo assim, foi realizado o procedimento de purificação da lipase, que consistiu na indução das células a 20 °C durante 16 h para maximizar a expressão da proteína, centrifugação e recuperação da fração solúvel, rompimento das células por sonicação e a purificação por cromatografia de afinidade (4.1.1) (FIGURA 17 A). As frações eluídas contendo a enzima foram reunidas e dialisadas em tampão Tris-HCl 50 mmol L⁻¹ pH 7,5 para eliminar o imidazol utilizado no tampão de eluição da proteína, e, em seguida, submetidas à eletroforese SDS-PAGE (FIGURA 17 B). Em seguida, a concentração de proteínas foi determinada e ensaios de atividade foram realizados. Os resultados obtidos estão resumidos na Tabela 5. A enzima foi parcialmente purificada com um rendimento de 15% e um fator de purificação de 1,3 vezes. Os baixos valores de rendimento e fator de purificação podem ter sido obtidos devido a possibilidade de haver uma elevada concentração da lipase no extrato bruto livre de células que conseqüentemente apresenta uma elevada atividade. A lipase purificada foi armazenada a 4 °C até ser utilizada no estudo de imobilização.

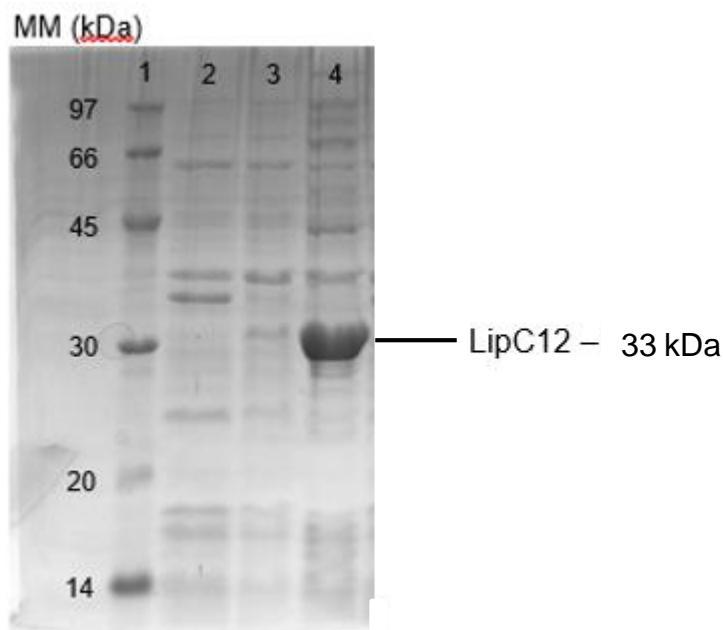


FIGURA 16 – ELETROFORESE SDS-PAGE DO TESTE DE EXPRESSÃO DA LIPASE LIPC12

Células de *E. coli* BL21(DE3) transformadas com o plasmídeo pET28a-*lipC12* induzidas com IPTG a 37°C em meio LB. Trilha 1: marcador de massa molecular; trilha 2: EB antes da adição de IPTG; trilha 3: EB após adição do IPTG e trilha 4: EB após 16 h de expressão.

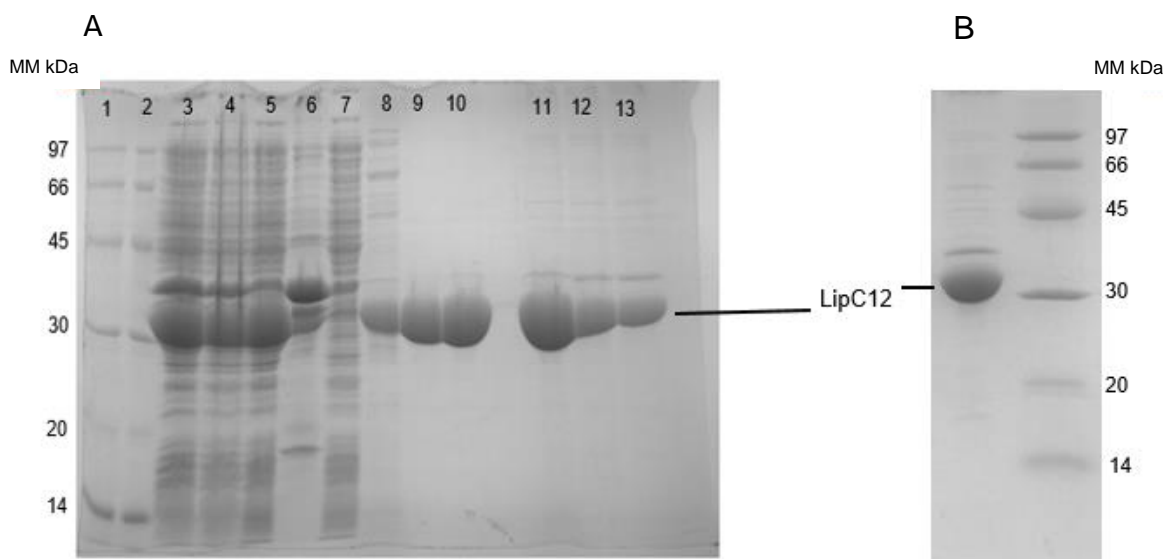


FIGURA 17 – ELETROFORESE SDS-PAGE DAS FRAÇÕES RESULTANTES DA PURIFICAÇÃO DA LIPASE LIPC12 POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE EM COLUNA DE NÍQUEL

A - Trilhas 1 e 2: marcadores de massa molecular; trilhas 3 a 5: extrato bruto – fração solúvel; trilha 6: precipitado insolúvel; trilha 7: eluição da maioria das proteínas que não são a lipase LipC12; trilhas 8 a 13: eluição da lipase LipC12 purificada. B – Trilha 1: frações da lipase purificada unidas e dialisadas; trilha 2: marcadores de massa molecular.

TABELA 5 - TABELA DE PURIFICAÇÃO DE LIPC12

Etapa	Volume (mL)	Proteína Total ^a (mg)	Atividade Total ^b (U)	Atividade específica (U mg ⁻¹)	Fator de Purificação ^c	Rendimento de atividade ^d (%)
Extrato livre de células	35	210	213990	1019	1	100
Cromatografia de afinidade	8	24	31896	1329	1,3	15

a - A determinação de proteína foi estimada utilizando o kit Pierce BCA Protein Assay.

b - Uma unidade de atividade (U): 1 μ mol de ácido graxo liberado por min, utilizando trioleína como substrato.

c - O fator de purificação foi calculado pela relação da atividade específica final contra a atividade específica inicial no extrato livre de células.

d - O rendimento de atividade foi calculado pela relação da atividade final contra a atividade total inicial no extrato livre de células.

5.1.1 Atividade de hidrólise de LipC12 purificada

Na Tabela 6 estão mostrados os dados de atividade hidrólise, em meio orgânico e em meio aquoso, de LipC12 nas seguintes formas: purificada em solução, purificada liofilizada e de extrato bruto solúvel (EB), que é a parte solúvel do extrato de proteínas após sonicação e centrifugação (4.1.1). LipC12 liofilizada apresentou uma reduzida atividade de hidrólise em meio aquoso e em meio orgânico (4 a 24 U mg⁻¹). Desta forma, concluiu-se que o processo de liofilização acarretou a perda de mais de 90% da atividade catalítica da lipase, que pode ocorrer tanto na fase do congelamento como durante secagem, pela retirada da água essencial que mantém a estrutura da enzima (GUPTA e ROY, 2004; LEE e DORDICK, 2002). Outra possibilidade para a reduzida atividade de LipC12 liofilizada foi a formação de agregados observada durante a medida da atividade de hidrólise, o que pode ter impedido o contato do substrato com o sítio ativo da enzima.

O EB apresentou atividade específica de 1019 U mg⁻¹ e alta atividade volumétrica de 6114 U mL⁻¹ (TABELA 6). Por outro lado, todos os preparados enzimáticos apresentaram baixa atividade em meio orgânico. As enzimas são menos

ativas em solventes anidros do que em água devido à sua limitada flexibilidade conformacional, ou seja, ao enrijecimento da conformação nativa da enzima (DANIEL et al., 2003; KLIBANOV, 1997).

TABELA 6 - ATIVIDADE DE HIDRÓLISE EM MEIO AQUOSO E EM MEIO ORGÂNICO DE DIFERENTES PREPARAÇÕES DA LIPASE LIPC12

Enzima	^a Meio aquoso		^b Meio orgânico	
	Atividade específica (U mg ⁻¹)	Proteína (mg mL ⁻¹)	Atividade volumétrica (U mL ⁻¹)	Atividade específica (U mg ⁻¹)
Purificada diluída*	1329	3	3987	24
Purificada liofilizada	153	3	-	4
EB solúvel**	1019	6	6114	19

*LipC12 purificada diluída em tampão Tris-HCl 50 mmol L⁻¹ pH 7,5.

**EB é a parte solúvel do extrato de proteínas após sonicação e centrifugação.

a – Hidrólise em meio aquoso: método titulométrico com trioleína, a 30 °C e pH 7,5.

b – Hidrólise em meio orgânico: 5 mL de *n*-hexano, 70 mmol L⁻¹ trioleína, 2% de água, 20 mg de enzima imobilizada, 180 rpm, 40 °C. Teor de ácidos graxos residuais analisado pelo método de Lowry-Tinsley.

5.1.2 Estabilidade de LipC12 purificada durante armazenamento

Uma parte da lipase purificada diluída em tampão (Tris-HCl 50 mmol L⁻¹ pH 7,5, 150 mmol L⁻¹ de NaCl, 5 mmol L⁻¹ de CaCl₂) foi utilizada para os ensaios de imobilização e outra parte permaneceu em geladeira (4 °C) para medida da estabilidade da sua atividade durante armazenamento. No quinto mês de armazenamento, a lipase apresentou 94% da atividade inicial (FIGURA 18), indicando que na forma purificada pode ser armazenada a 4 °C até imobilização.

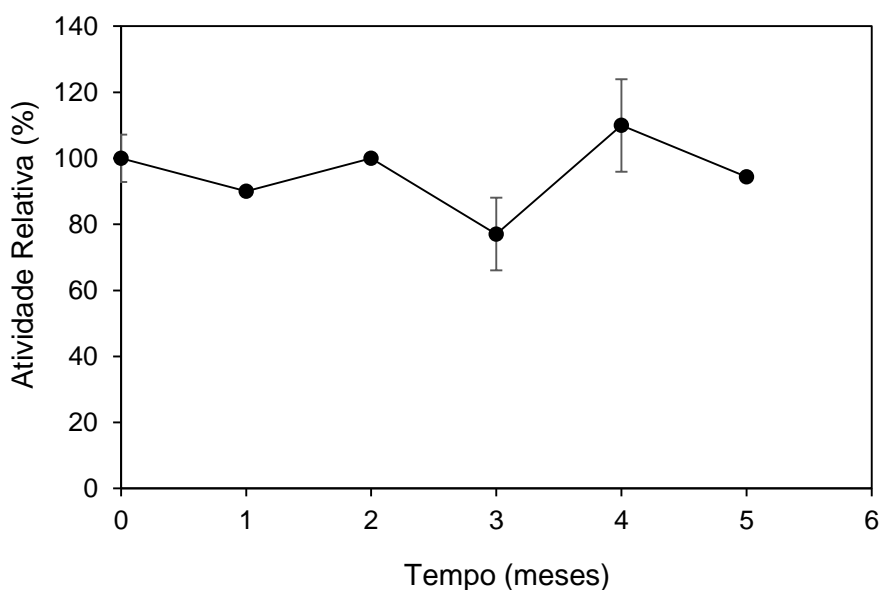


FIGURA 18 - ESTABILIDADE DA LIPASE LIPC12 PURIFICADA DURANTE O ARMAZENAMENTO A 4 °C

Atividade relativa: percentagem de atividade de hidrólise relativa à atividade inicial de LipC12 purificada (1319 U g^{-1}) determinada pelo método titulométrico utilizando a trioleína como substrato, a 30 °C e pH 7,5.

5.1.3 Atividade de esterificação de LipC12

A atividade de esterificação de LipC12 purificada foi avaliada através da reação de síntese do oleato de etila em *n*-hexano (4.3.1). Entretanto, visto que a reação de esterificação ocorre em meio orgânico, a enzima primeiramente foi liofilizada para remoção da água que poderia deslocar o equilíbrio da reação no sentido da hidrólise. Em seguida, 1,1 mg da enzima em pó foi utilizado nas reações. A conversão em éster foi de apenas 9%, e como este valor está dentro da margem de erro do método (10%), concluiu-se que LipC12 liofilizada não apresentou atividade de esterificação nas condições do ensaio.

Considerando que LipC12 na forma livre apresentou baixa atividade em solventes orgânicos, decidiu-se pela imobilização, visto que o principal objetivo deste trabalho era a aplicação de LipC12 em reações de síntese de ésteres.

5.2 ESTUDOS DE IMOBILIZAÇÃO DE LIPC12 PURIFICADA

5.2.1 Imobilização e caracterização de LipC12 em Accurel MP-1000

Os experimentos iniciais de imobilização de LipC12 foram feitos no suporte Accurel MP-1000, uma vez que têm sido obtidos bons resultados em nosso laboratório, quando outras lipases foram imobilizadas neste suporte (MADALOZZO et al., 2014; BARON et al., 2011; SALUM et al., 2008).

A cinética de imobilização (FIGURA 19) de LipC12 em Accurel mostrou que, para a carga de proteína de 5 mg g^{-1} , a saturação do suporte ocorre em 24 h, e para cargas entre 10 e 25 mg g^{-1} , a saturação do suporte ocorre em 12 h.

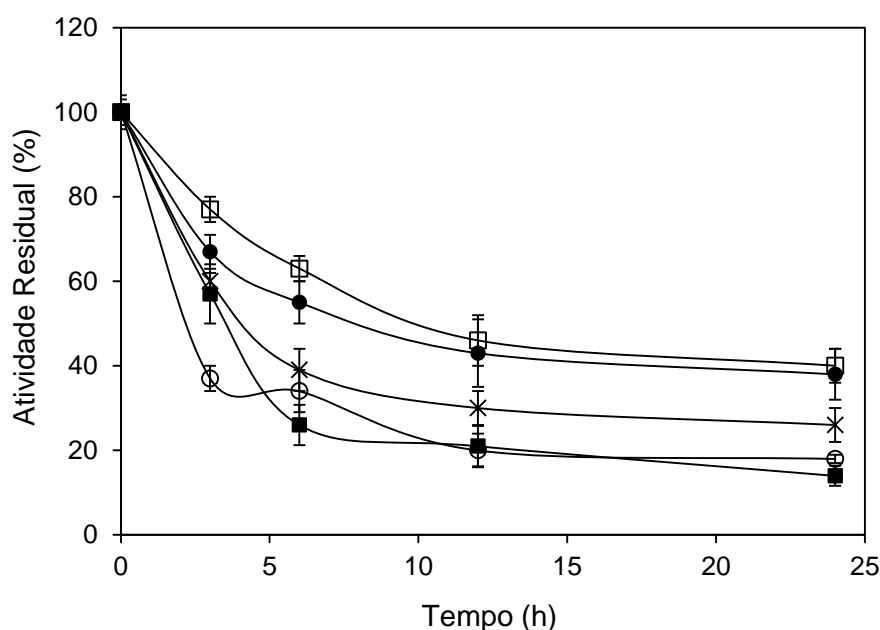


FIGURA 19 - CINÉTICA DE IMOBILIZAÇÃO DE LIPC12 EM ACCUREL MP-1000 EM TERMOS DE ATIVIDADE RESIDUAL DO SOBRENADANTE

Legenda: (■) 5 mg g^{-1} ; (○) 10 mg g^{-1} ; (x) 15 mg g^{-1} ; (●) 20 mg g^{-1} e (□) 25 mg g^{-1} .

Atividade Residual: hidrólise em meio aquoso-método titulométrico com trioleína, a 30°C e pH 7,5.

Além de definir o tempo de imobilização ideal para cada carga de proteína estudada, a cinética de imobilização (FIGURA 19) permitiu o cálculo do parâmetro eficiência de imobilização (E), que é a razão entre a atividade final e atividade inicial

no sobrenadante. Os parâmetros E e atividade de hidrólise do preparado imobilizado podem auxiliar na escolha da carga de proteína ideal a ser imobilizada.

Observou-se que E foi máximo (86%) para a menor carga de proteína utilizada, 5 mg g⁻¹, mas foi com a carga de 20 mg g⁻¹ que Acc-LipC12 apresentou o maior valor de atividade de hidrólise em meio aquoso, 866 U g⁻¹ (TABELA 7). Suportes como o Accurel que interagem com a enzima por adsorção podem promover a dessorção da proteína do suporte quando colocadas sob agitação em meio aquoso, o que pode levar a um incremento na atividade medida. Assim sendo, a atividade de hidrólise em meio orgânico também foi determinada para Acc-LipC12 imobilizada com todas as cargas de proteínas estudadas (TABELA 7).

TABELA 7 – CARACTERIZAÇÃO DE LIPC12 IMOBILIZADA EM ACCUREL MP-1000 COM DIFERENTES CARGAS DE PROTEÍNA

Carga de Proteína (mg g ⁻¹)	E (%) ^a	Atividade em meio aquoso (U g ⁻¹) ^b	Atividade em meio orgânico (U g ⁻¹) ^c	R _{O/A} ^d	Atividade teórica em meio orgânico (U g ⁻¹) ^e	R (%) ^f
5	86	281 ± 1	323 ± 8	1,15	103	313
10	82	323 ± 2	360 ± 2	1,11	197	183
15	74	631 ± 23	301 ± 1	0,48	266	113
20	62	866 ± 10	323 ± 12	0,37	298	109
25	60	799 ± 4	316 ± 2	0,39	360	88

a - Eficiência de imobilização calculada por diferença entre a atividade inicial e final no sobrenadante.

b – Hidrólise em meio aquoso: método titulométrico com trioleína, a 30 °C e pH 7,5.

c – Hidrólise em meio orgânico: 5 mL de *n*-hexano, 70 mmol L⁻¹ trioleína, 2% de água, 20 mg de enzima imobilizada, 180 rpm, 40 °C. Teor de ácidos graxos residuais analisado pelo método de Lowry-Tinsley.

d – Razão entre atividade de hidrólise em meio aquoso e atividade de hidrólise em meio orgânico.

e – O cálculo da atividade teórica foi baseado na Equação 3 (4.1.4).

f – Retenção de atividade é a razão entre a atividade observada (U g⁻¹) e atividade teórica da preparação imobilizada (U g⁻¹) em *n*-hexano.

As atividades de hidrólise em meio orgânico foram mais baixas para cargas de proteína iguais ou maiores que 15 mg g⁻¹ (TABELA 7), comparadas às atividades da enzima em meio aquoso. Observou-se também uma tendência de aumento de atividade quando se utilizou até 10 mg g⁻¹, mas no geral as diferenças não foram significativas ($p > 0,05$) entre as cargas de proteína utilizadas.

A alta retenção de atividade (R) em meio orgânico encontrada para Acc-LipC12 com cargas de proteína de até 20 mg g⁻¹ mostra que as atividades de hidrólise em meio orgânico observadas foram maiores do que previu a atividade teórica, indicando a ativação de LipC12 mediante a imobilização. Os valores superiores a 100% de retenção da atividade, que foram obtidos em alguns casos, não são incomuns para as lipases e são atribuídos à imobilização da lipase na conformação aberta promovendo a ativação da enzima (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1998). Outro fator que pode proporcionar a ativação de lipases imobilizadas em um suporte hidrofóbico é a maior concentração de substrato em torno da lipase adsorvida (RESLOW, ADLERCREUTZ e MATTIASSON, 1988).

O valor de R mais alto foi obtido para a menor carga de proteína (5 mg g⁻¹, 313%), mas para Acc-LipC12 com cargas de proteína até 20 mg g⁻¹, o valor de R ainda foi maior que 100%. Segundo Montero et al. (1993), cargas elevadas de proteína saturam o suporte e dificultam a ativação da lipase imobilizada pela formação de multicamadas de proteínas na superfície do suporte.

Pencreac'h e Baratti (1996) relacionaram a atividade em meio aquoso e orgânico de 32 lipases liofilizadas e propuseram um novo parâmetro, a razão entre as atividades em meio orgânico e aquoso ($R_{O/A}$). Dentre as lipases testadas por estes autores foi verificado que apenas seis apresentaram valores de $R_{O/A}$ superiores a 1, ou seja, maior atividade em meio orgânico. No presente trabalho, Acc-LipC12 com cargas de proteína entre 5 e 10 mg g⁻¹ apresentou $R_{O/A}$ de 1,1, o que pode ser considerado um bom resultado, pois em geral, lipases possuem atividade significativamente menor em meio orgânico do que em meio aquoso (RAHMAN et al., 2005; PENCREAC'H e BARATTI, 1996). No entanto, a dosagem da atividade hidrolítica em meio orgânico é importante, porque evita a dessorção da enzima imobilizada ao meio reacional e mostra que a enzima é ativa em solventes orgânicos (BARON, 2008).

Considerando que Acc-LipC12 com cargas de proteína de 5 e 10 mg g⁻¹ apresentou os melhores valores E, $R_{O/A}$ e R, a atividade de esterificação e conversão em éster foram avaliados para estes preparados imobilizados. Acc-LipC12 com 10 mg g⁻¹ catalisou 86% de conversão em oleato de etila em 7 h (18 U g⁻¹), enquanto que Acc-LipC12 com 5 mg g⁻¹ catalisou 62% em 8 h com atividade de 6 U g⁻¹ (FIGURA 20). Portanto, a carga de proteína de 10 mg g⁻¹ foi escolhida para a continuação do estudo.

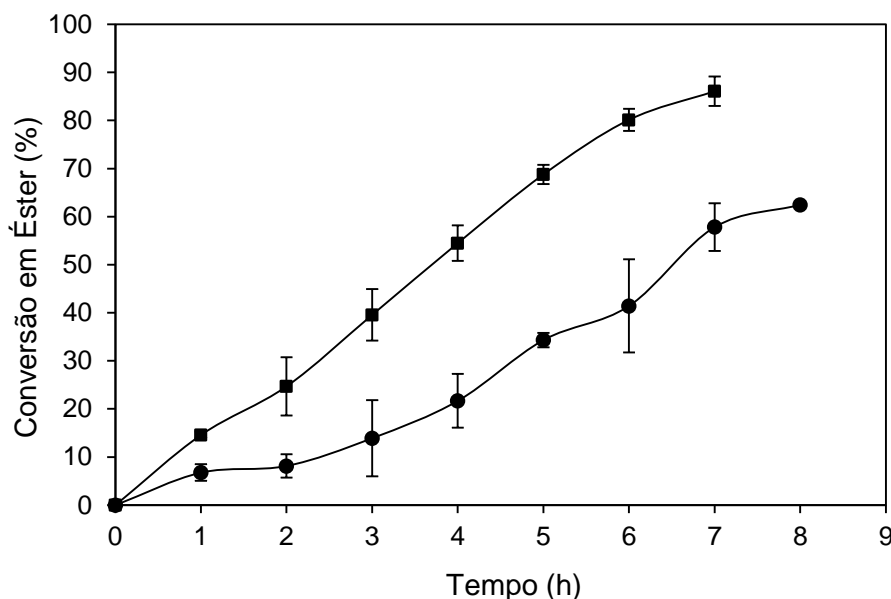


FIGURA 20 - SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA CATALISADA POR LIPC12 IMOBILIZADA EM ACCUREL MP-1000

Legenda: (●) 5 mg g⁻¹ e (■) 10 mg g⁻¹.

Condições: Meio reacional de 5 mL com 70 mmol L⁻¹ de ácido oleico, 210 mmol L⁻¹ de etanol em *n*-hexano; 110 mg de lipase imobilizada, 40 °C e 180 rpm. Teor de ácidos graxos residuais analisado pelo método de Lowry-Tinsley.

Os resultados de imobilização de lipases e esterases encontrados na literatura são diversos e dependem da fonte da enzima e das condições de imobilização. Kolling et al. (2011) imobilizaram uma esterase recombinante de *Lactobacillus platarum* em Accurel MP-1000, e consideraram o tempo de 18 h e carga proteica de 12,4 mg g⁻¹ ideais devido à alta atividade de hidrólise em meio aquoso apresentada pela esterase imobilizada (1800 U g⁻¹) contra o substrato sintético butirato de *p*-nitrofenila. Salum et al. (2008) encontraram que a carga de proteína de 25 mg g⁻¹ e o tempo de 6 h foram adequados para imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* em Accurel EP-100, visto que a lipase apresentou a maior atividade de hidrólise em meio orgânico (5 U g⁻¹) contra o substrato sintético palmitato de *p*-nitrofenila. Já Almeida et al. (2008) utilizaram um tempo de apenas 15 min para imobilização de uma esterase recombinante de *Pyrococcus furiosus* (Pf2001) em Accurel MP-1000, com carga de proteína de 18 mg g⁻¹. No entanto, a atividade de hidrólise em meio aquoso desta lipase imobilizada foi de apenas 4 U g⁻¹ contra o éster heptanoato de metilumbeliferila.

Em relação ao rendimento em éster pode-se considerar que Acc-LipC12 apresentou um bom desempenho, quando estes valores são comparados com os de

outras lipases imobilizadas em Accurel. A lipase recombinante de *Rhizopus oryzae* em Accurel EP-100 catalisou a conversão de 100% de butirato de etila em *n*-hexano, mas no tempo 24 h (GUILLÉN, BENAIGES e VALERO, 2012). Baron et al. (2011), após obtenção da lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 imobilizada em Accurel MP-1000 pelo método de SPIL (*Simultaneous Production and Immobilization of Lipases*), encontraram conversão de 95% em éster em 1 h na síntese do oleato de etila em *n*-heptano. Entretanto, a comparação de atividade de esterificação de diferentes enzimas torna-se difícil considerando as diferenças que existem em termos de sistema de reação, carga de proteína imobilizada e quantidade de enzima imobilizada adicionada no meio reacional.

5.2.2 Imobilização e caracterização de LipC12 em Membrana de polipropileno, Celite 545 e Immobead 150

Após estudar a imobilização de LipC12 no suporte hidrofóbico Accurel MP-1000, outros suportes, com diferentes tipos de interação/ligação com a proteína, também foram estudados. Os suportes utilizados foram membrana de polipropileno ativada com glutaraldeído (ligação covalente), Celite 545 (interação iônica) e Immobead 150 (ligação covalente).

5.2.2.1 Produção e ativação da Membrana de Polipropileno

A membrana de polipropileno (MP) foi produzida, funcionalizada e ativada em laboratório (4.1.3.3). Portanto, antes do estudo da cinética de imobilização, foi verificada a concentração ideal de glutaraldeído (de 0,5 a 2%) a ser utilizada para a ativação no suporte. Para cada concentração, foi feito um ensaio de imobilização com carga de proteína de 2 mg g⁻¹. O controle representa a MP sem ativação com glutaraldeído. A Figura 21 mostra que, para MP com concentração de 0,5% de glutaraldeído, a saturação do suporte ocorre em 24 h, com E de 70%. MPs tratados com 1 e 2% de glutaraldeído, proporcionaram valores de E de 67 e 85%,

respectivamente, em 24 h; porém estes valores aumentaram para 76 e 91%, respectivamente, após 48 h. Quando LipC12 foi ligada ao suporte sem ativação com o glutaraldeído (controle) o valor de E encontrado foi de 68% em 48 h (FIGURA 21), ou seja, menor que no suporte ativado. A ativação da membrana com 2% de glutaraldeído proporcionou maior eficiência de imobilização ($p < 0,05$) do que o controle (suporte sem ativação). No entanto, não houve diferença na eficiência de imobilização ($p > 0,05$) de LipC12 nas MPs com concentrações de glutaraldeído entre 0,5 e 2%. Portanto, para a escolha da melhor concentração de glutaraldeído, a atividade de hidrólise de LipC12 imobilizada em MP (MP-LipC12) também foi avaliada.

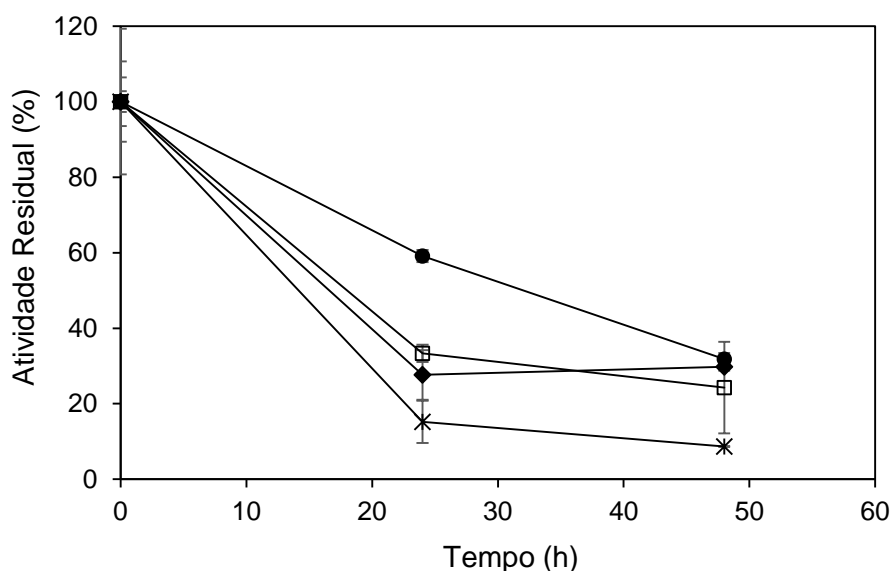


FIGURA 21 – CINÉTICA DE IMOBILIZAÇÃO DE LIPC12 EM MEMBRANA DE POLIPROPILENO ATIVADA COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GLUTARALDEÍDO

Legenda: (●) Controle sem adição de glutaraldeído; (◆) 0,5%; (□) 1% e (*) 2%.

Atividade residual no sobrenadante: hidrólise em meio aquoso-método titulométrico com trioleína, a 30 °C e pH 7,5.

A ativação de MP com 2% de glutaraldeído resultou em maiores valores de atividade de hidrólise em meio aquoso ($194 \pm 10 \text{ U g}^{-1}$) e em meio orgânico ($66 \pm 9 \text{ U g}^{-1}$) (TABELA 8). Entretanto, em termos de atividade de hidrólise em meio orgânico não houve diferença estatística entre as amostras ($p > 0,05$) e, em meio aquoso, o preparado imobilizado com 2% de glutaraldeído apresentou atividade

significativamente maior que o controle, mas não houve diferença em relação aos demais preparados imobilizados. No estudo de Bayramoglu et al. (2011), no qual a metodologia de produção e ativação da MP foi baseada, os autores relataram a ativação da membrana com uma concentração máxima de 2% de glutaraldeído. Assim, no presente trabalho, mesmo não havendo diferença significativa em termos de eficiência de imobilização e atividade de hidrólise entre os preparados imobilizados ativados, a concentração de 2% de glutaraldeído foi escolhida para continuação do estudo.

TABELA 8 - CARACTERIZAÇÃO DE LIPC12 IMOBILIZADA EM MEMBRANA DE POLIPROPILENO ATIVADA COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GLUTARALDEÍDO

Glutaraldeído (%)	Eficiência de imobilização (E) (%) ^a	Atividade em meio aquoso (U g ⁻¹) ^b	Atividade em meio orgânico (U g ⁻¹) ^c
Controle	68	162 ± 8	55 ± 6
0,5	70	175 ± 16	59 ± 10
1	76	176 ± 1	54 ± 8
2	91	194 ± 10	66 ± 9

a - Eficiência de imobilização calculada por diferença entre a atividade inicial e final no sobrenadante

b – Hidrólise em meio aquoso: método titulométrico com trioleína, a 30 °C e pH 7,5.

c – Hidrólise em meio orgânico: 5 mL de *n*-hexano, 70 mmol L⁻¹ trioleína, 2% de água, 20 mg de enzima imobilizada, 180 rpm, 40 °C. Teor de ácidos graxos residuais analisado pelo método de Lowry-Tinsley.

5.2.2.2 Seleção do suporte de imobilização

Nesta etapa, foram realizados experimentos de imobilização de LipC12 nos suportes MP ativada com glutaraldeído (2%), Celite 545 e Immobead 150. A fim de proporcionar uma base de comparação com os resultados obtidos para Accurel MP-1000, a imobilização de LipC12 em todos os suportes foi realizada com cargas de proteínas de 10 mg g⁻¹. Os parâmetros eficiência de imobilização (E) e atividade de hidrólise em meio aquoso e em meio orgânico de cada preparado enzimático foram estudados e estão apresentados na Tabela 9.

A imobilização de LipC12 em Immobead 150 (Ibead-LipC12) foi mais eficiente ($E = 100\%$) do que em Accurel MP-1000 ($E = 86\%$). Entretanto, para LipC12 imobilizada em Celite (Cel-LipC12) e em MP (MP-LipC12) os valores de E ficaram em torno de 50%, ou seja, menor do que Acc-LipC12 (TABELA 7).

TABELA 9 - CARACTERIZAÇÃO DE LIPC12 IMOBILIZADA EM DIFERENTES SUPORTES

Suporte	E (%) ^a	Atividade em meio aquoso (U g ⁻¹) ^b	Atividade em meio orgânico (U g ⁻¹) ^c	$R_{O/A}$ ^d	Atividade teórica em meio orgânico (U g ⁻¹) ^e	(R) (%) ^f
Accurel MP-1000*	82	323 ± 2	360 ± 2	1,11	197	183
Membrana de Polipropileno**	55	801 ± 183	96 ± 18	0,12	132	73
Celite 545**	48	1089 ± 46	188 ± 23	0,17	115	163
Immobead 150***	100	112 ± 5	161 ± 24	1,43	240	67

Os valores de Acc-LipC12 (10 mg g⁻¹) apresentados nesta tabela são os mesmos da Tabela 6, que foram repetidos aqui para comparação com os demais suportes.

a – Eficiência de imobilização calculada por diferença entre a atividade inicial e final no sobrenadante.

b – Hidrólise em meio aquoso: método titulométrico com trioleína, a 30 °C e pH 7,5.

c – Hidrólise em *n*-hexano: 5 mL de *n*-hexano, 70 mmol L⁻¹ trioleína, 2% de água, 20 mg de enzima imobilizada, 200 rpm, 40 °C. Teor de ácidos graxos residuais analisado pelo método de Lowry-Tinsley.

d – Razão entre atividade de hidrólise em meio aquoso e atividade de hidrólise em meio orgânico.

e - O cálculo da atividade teórica foi baseado na Equação 3 (4.1.4).

f – Retenção de atividade (R) é a razão entre a atividade observada (U g⁻¹) e atividade teórica da preparação imobilizada

(U g⁻¹) em *n*-hexano.

*12 h de imobilização

**48 h de imobilização

*** 6 h de imobilização

A carga de proteína utilizada em todos os preparados imobilizados foi de 10 mg g⁻¹.

Em relação a Cel-LipC12, a reduzida eficiência de imobilização pode ter ocorrido devido a presença da cauda His na estrutura da lipase, a qual pode interferir na imobilização ou também promover alterações na estrutura da lipase (HANG et al., 1999). Peng, Lin e Wei (2011), que imobilizaram a lipase de *Pseudomonas aeruginosa*, com cauda His, no suporte Celite 545, também encontraram um baixo valor de eficiência de imobilização, apenas 18,5%. A hidrofiliabilidade deste suporte

também pode ter contribuído para a baixa eficiência de imobilização de LipC12 no presente trabalho, visto que dificilmente ocorrerá ativação interfacial da lipase.

Em relação à MP, a ausência de porosidade em sua estrutura pode ter contribuído para saturação do suporte ocorrer com 50% da proteína oferecida para imobilização. Geralmente, suportes porosos possuem uma elevada área superficial e assim possibilitam a imobilização de uma carga maior de proteínas (SABBANI et al., 2006; SALIS et al., 2003), o que não ocorreu com a MP ativada com glutaraldeído.

As atividades de hidrólise em meio orgânico, tanto de Cel-LipC12 como de MP-LipC12 foram muito menores que em meio aquoso, o que refletiu em baixos valores de $R_{O/A}$, 0,17 (Cel-LipC12) e 0,12 (MP-LipC12) (TABELA 9). No caso de Cel-LipC12, assim como já foi relatado para Acc-LipC12, a alta atividade de hidrólise em meio aquoso ($1089 \pm 46 \text{ U g}^{-1}$) pode não representar a atividade da enzima imobilizada, visto que a imobilização ocorre por adsorção e pode haver a dessorção da enzima do suporte. A alta atividade de hidrólise em meio aquoso e baixa atividade em meio orgânico apresentada por MP-LipC12 pode estar relacionada à forma como a enzima está imobilizada. A inserção de “braços” espaçadores na MP (durante a aminação com hexametilenodiamina e ativação com glutaraldeído) permite que todas as áreas da lipase imobilizada sejam acessíveis ao substrato em meio aquoso, mas em meio orgânico a lipase fica desprotegida da ação do solvente, que pode promover a formação de agregados entre as próprias moléculas de lipase com o glutaraldeído (BAYRAMOGLU et al., 2011).

Ibead-LipC12 apresentou atividade de hidrólise em meio orgânico maior que em meio aquoso, o que promoveu um valor de $R_{O/A}$ de 1,43 (TABELA 9). A menor atividade de hidrólise em meio aquoso de Ibead-LipC12 pode ter ocorrido devido a hidrofobicidade do suporte. A hidratação em torno do suporte promove a formação de agregados, levando a limitações difusionais internas para o acesso do substrato hidrofóbico ao sítio ativo (ALNOCH, 2013; PERSSON et al., 2002). Em meio aquoso, o acesso do substrato insolúvel ao interior dos poros também pode ser dificultado se as gotículas de gordura não estiverem no tamanho adequado em relação ao tamanho do poro do suporte, promovendo assim menor atividade da lipase imobilizada (PENCREACH, LEULLIER e BARATTI, 1997).

De todos os suportes estudados, Immobead 150 foi o que proporcionou o maior valor de $R_{O/A}$ (1,43) e o Accurel MP-1000 foi o que proporcionou o maior valor de retenção de atividade ($R = 183\%$). No entanto, antes de definir a escolha dos melhores

suportes para continuar o estudo, a atividade de esterificação de todos os preparados imobilizados foi avaliada.

5.2.2.3 Atividade de esterificação e conversão em éster

Todos os derivados imobilizados preparados com LipC12 purificada (Cel-LipC12, Ibead-LipC12 e MP-LipC12) foram utilizados na reação de síntese do oleato de etila (4.3.1) para medida da atividade de esterificação que, em conjunto com os demais parâmetros estudados, auxiliou na escolha da melhor preparação para aplicação na síntese de ésteres. Quando Ibead-LipC12 foi utilizado, uma conversão em éster de 95% em 4 h foi obtida, com atividade de esterificação de 29 U g^{-1} (FIGURA 22).

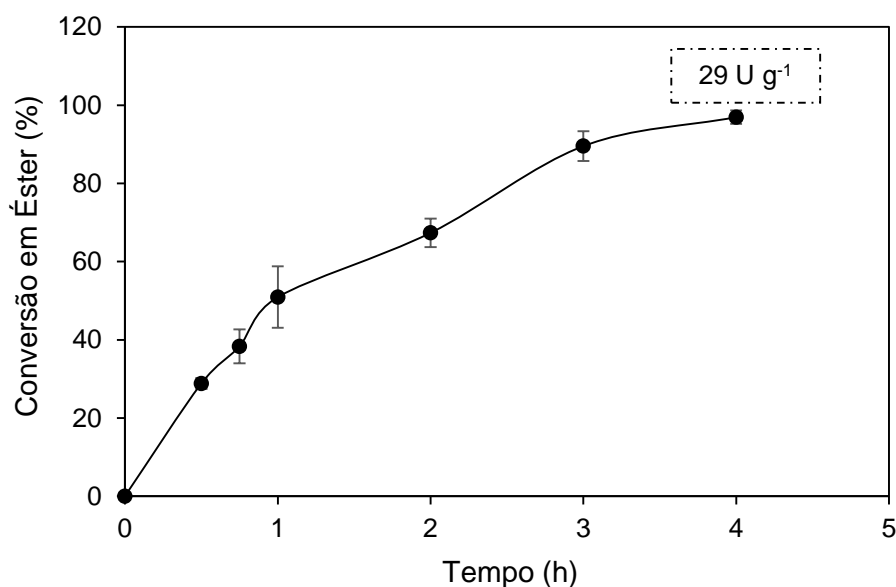


FIGURA 22 - SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA CATALISADA POR LIPC12 IMOBILIZADA EM IMMOBEAD 150

Legenda: (●) Ibead-LipC12 10 mg g^{-1} .

Condições: Meio reacional de 5 mL com 70 mmol L^{-1} de Ácido Oleico, 210 mmol L^{-1} de etanol em *n*-hexano; 110 mg de lipase imobilizada, 40°C e 180 rpm. Teor de ácidos graxos residuais analisado pelo método de Lowry-Tinsley.

MP-LipC12 e Cel-LipC12 não apresentaram atividade, mesmo após 6 h de incubação. A reduzida eficiência de imobilização destes suportes (MP 55% e Celite 48%) pode ter colaborado para este resultado. Bayramoglu et al. (2011) utilizaram a lipase de *C. rugosa* imobilizada em MP ativada com glutaraldeído, e detectaram conversão de apenas 35% após 24 h de reação de síntese do valerato de etila (aroma de maçã verde) em *n*-hexano. Os autores sugerem que esta baixa atividade está associada à imobilização da enzima de uma forma não ativa, o que também pode ter ocorrido com LipC12. Além disso, conforme discutido em 5.2.2.2, o acesso do solvente orgânico à enzima pode promover a formação de agregados entre as moléculas de proteína e o glutaraldeído, interferindo na atividade da lipase.

Conforme descrito anteriormente, o baixo valor de E encontrado para Cel-LipC12 pode estar relacionado à presença da cauda His na estrutura da lipase, e isto pode ter influenciado na catálise enzimática da reação de esterificação. Uma situação semelhante foi encontrada por Horchani et al. (2009), que imobilizaram a lipase de *Staphylococcus aureus* recombinante com cauda His no suporte CaCO_3 e identificaram E <10% e conversão em éster de apenas 17% na síntese do oleato de butila. No entanto, além desta característica que LipC12 apresenta que é a cauda His, a natureza hidrofílica do suporte também pode ter contribuído para Cel-LipC12 não apresentar atividade de esterificação. Segundo Malcata et al. (1990), suportes hidrofílicos geralmente são caracterizados por promover a perda de atividade da lipase após a imobilização. Esta perda de atividade geralmente é atribuída aos seguintes fatores: alteração na conformação da lipase após a adsorção; uma pequena quantidade de lipase está imobilizada; diminuição na capacidade de substratos hidrofóbicos para alcançar o sítio ativo da lipase e, existência de impedimento estérico imposto pelo suporte que limita a flexibilidade da molécula de lipase. Esta situação não foi detectada em meio aquoso (TABELA 9) pela possibilidade de ter havido dessorção da enzima do suporte.

5.2.3 Reutilização de LipC12 imobilizada em reações de síntese do oleato de etila

Para verificar a estabilidade de LipC12 na síntese do oleato de etila, os preparados imobilizados Acc-LipC12 e Ibead-LipC12, que apresentaram atividade de

esterificação, foram utilizados em 10 ciclos de reações de esterificação sucessivos.

Ibead-LipC12 foi mais estável que Acc-LipC12, o qual perdeu toda sua atividade após o 4º ciclo (FIGURA 23). A conversão obtida com Ibead-LipC12 diminuiu gradativamente ao longo dos ciclos, mas ainda manteve-se em 74% no décimo ciclo reacional.

O aumento da estabilidade de lipases quando imobilizadas por ligações covalentes é um fenômeno conhecido e pode ser atribuído à preservação de suas estruturas cataliticamente ativas, mesmo quando submetidas a condições potencialmente desnaturantes (calor, solventes orgânicos) (MATEO et al., 2007a). Resultado semelhante foi encontrado para ROL (lipase de *Rhizopus oryzae*) imobilizada em Eupergit C, que pode ser reutilizada por 6 ciclos de 23 h na síntese de um lipídio estruturado em sistema livre de solvente, mantendo em torno de 80% da atividade inicial (NUNES et al., 2011). Dhake et al. (2012) imobilizaram uma lipase pancreática comercial (origem não relatada) em Immobead-350 e verificaram que o mesmo preparado imobilizado pode ser utilizado durante 5 ciclos de reação de transesterificação entre óleo de girassol e metanol em sistema livre de solvente, mantendo 85% da atividade inicial no 5º ciclo de reação.

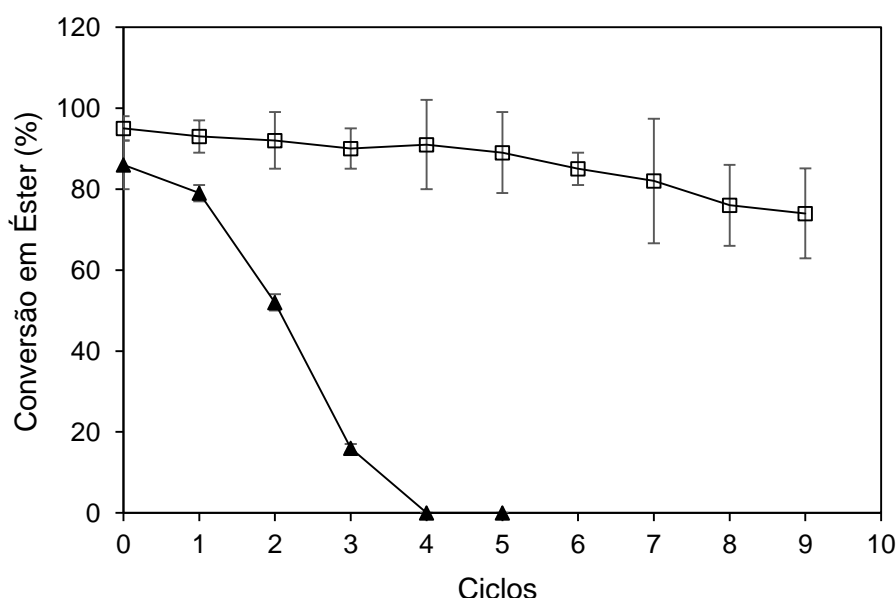


FIGURA 23 - ESTABILIDADE DE LIPC12 IMOBILIZADA EM ACCUREL MP-1000 E IMMOBEAD 150 FRENTE A VÁRIOS CICLOS DE REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO

Legenda: (▲) Acc-LipC12 e (□) Ibead-LipC12.

Condições: Meio reacional de 5 mL com 70 mmol L⁻¹ de Ácido Oleico, 210 mmol L⁻¹ de etanol em *n*-hexano; 110 mg de lipase imobilizada, 40 °C e 180 rpm. Teor de ácidos graxos residuais analisado pelo método de Lowry-Tinsley.

5.3 IMOBILIZAÇÃO DE LIPC12 A PARTIR DO EXTRATO BRUTO

5.3.1 Imobilização e caracterização de LipC12 em Accurel MP-1000 a partir do extrato bruto

O método de adsorção hidrofóbica seletiva em suportes ativados por diferentes grupos hidrofóbicos de baixa força iônica tem sido usado para concentrar e purificar lipases presentes no extrato bruto (EB) de proteínas (SABUQUILHO et al., 1998). Portanto, com o objetivo de verificar a possibilidade de purificar LipC12 através do processo de imobilização, foram realizados ensaios de imobilização em Accurel MP-1000, utilizando o EBLipC12, que é a parte solúvel do extrato de proteínas após sonicação e centrifugação (4.2.1).

O primeiro ensaio de imobilização foi realizado com uma carga de proteína de 300 mg g^{-1} e tempos de incubação de 24 a 72 h. A saturação do suporte ocorreu em 24 h, não havendo diferença na atividade e proteína residual no sobrenadante após este período (FIGURA 24).

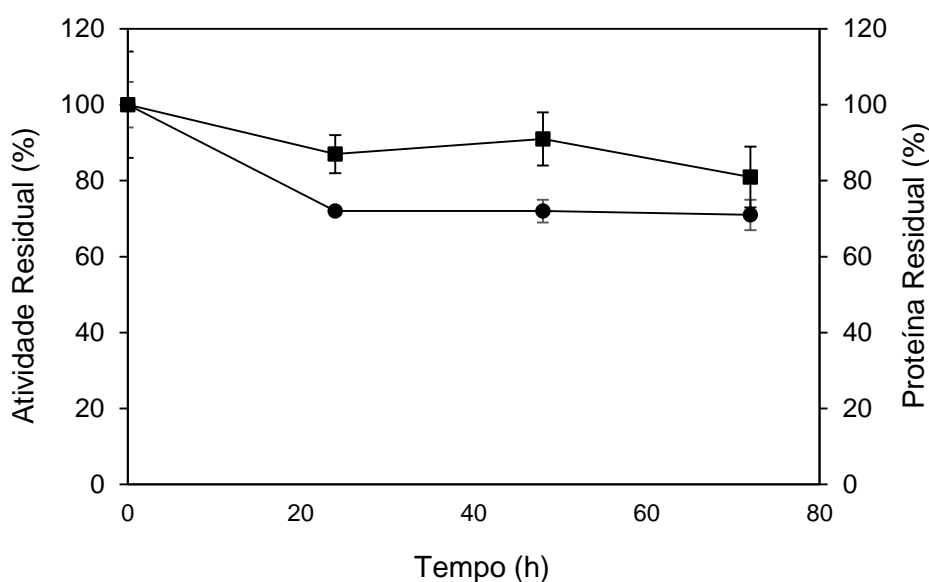


FIGURA 24 - CINÉTICA DE IMOBILIZAÇÃO DE LIPC12 EM ACCUREL MP-1000 A PARTIR DO EXTRATO BRUTO

Legenda: (●) Atividade residual no sobrenadante e (■) Proteína residual no sobrenadante
 Extrato Bruto: células de *E.coli* foram rompidas por sonicação, a parte solúvel recuperada após centrifugação foi dialisada para retirada do imidazol.
 Atividade Residual: hidrólise em meio aquoso-método titulométrico com trioleína, a 30 °C e pH 7,5.
 Proteína residual: método do ácido bicinconínico (BCA).

A eficiência de imobilização ($E = 29\%$) foi muito menor do que quando imobilizou-se LipC12 purificada (10 mg g^{-1} , $E = 82\%$), e somente 19% do total inicial de proteínas foram imobilizadas no suporte (57 mg g^{-1}). A atividade de hidrólise do preparado imobilizado foi de apenas $364 \pm 29 \text{ U g}^{-1}$ (TABELA 10), um valor muito próximo ao encontrado para Acc-LipC12 imobilizado com 10 mg g^{-1} ($360 \pm 2 \text{ U g}^{-1}$), indicando que a imobilização não ocorreu de forma seletiva.

TABELA 10 - CARACTERIZAÇÃO DE LIPC12 IMOBILIZADA EM ACCUREL MP-1000 A PARTIR DO EXTRATO BRUTO (ACC-EBLIPC12)

Carga de proteína inicial (mg g^{-1})	Eficiência de imobilização (E) (%) ^a	Carga de proteína final (mg g^{-1}) ^b	Atividade em meio orgânico (U g^{-1}) ^c
300	29	57	364 ± 29

Extrato Bruto: células (*E.coli*) foram rompidas por sonicação, a parte solúvel recuperada após centrifugação foi dialisada para retirada do imidazol.

a – Eficiência de imobilização calculada por diferença entre a atividade inicial e final no sobrenadante.

b – Proteína residual do sobrenadante determinada pelo método do ácido bicinonínico (BCA).

c – Hidrólise em meio orgânico: 5 mL de *n*-hexano, 70 mmol L⁻¹ trioleína, 2% de água (v/v), 20 mg de enzima imobilizada, 180 rpm, 40 °C. Teor de ácidos graxos residuais analisado pelo método de Lowry-Tinsley.

Considerando que a carga de proteína de 300 mg g^{-1} provocou uma baixa eficiência de imobilização (29%) e pode ter impossibilitado a adsorção seletiva de lipases, um estudo utilizando-se cargas menores de proteína foi realizado. As Figuras 25 A e 25 B representam a cinética de imobilização de LipC12 em Accurel MP-1000 a partir do EB com cargas de proteína entre 5 e 25 mg g^{-1} . Estas quantidades foram adequadas através de diluição de EBLipC12 em tampão Tris-HCl 50 mmol L⁻¹ pH 7,5, sendo que para a carga de 300 mg g^{-1} , utilizada anteriormente, o EBLipC12 foi utilizado na sua forma original sem diluição.

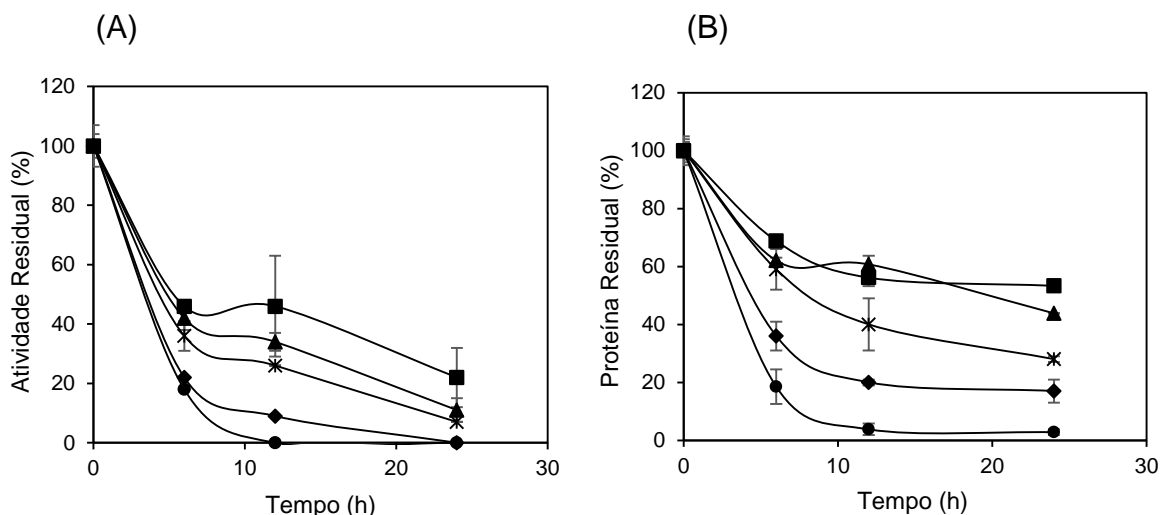


FIGURA 25 - CINÉTICA DE IMOBILIZAÇÃO DE LIPC12 A PARTIR DO EXTRATO BRUTO EM ACCUREL MP-1000 COM DIFERENTES CARGAS DE PROTEÍNA

Legenda: (A) Atividade residual no sobrenadante (B) Proteína Residual no Sobrenadante. (●) 5 mg g⁻¹; (◆) 10 mg g⁻¹; (*) 15 mg g⁻¹; (▲) 20 mg g⁻¹ e (■) 25 mg g⁻¹. Atividade Residual: hidrólise - método titulométrico com trioleína, a 30 °C e pH 7,5. Proteína residual: método do ácido bicinconínico (BCA).

Pode-se notar na Figura 25 A que o tempo de imobilização ideal para cargas de proteína de 5 e 10 mg g⁻¹ foi de 12 h, sendo que para cargas de proteína de 15 mg g⁻¹ ou mais, a redução da atividade residual no sobrenadante continuou até 24 h.

Uma alta eficiência de imobilização (E) foi obtida para Acc-EBLipC12 com cargas de proteína entre 5 e 15 mg g⁻¹ (94 a 85%) (TABELA 11). No entanto, os valores de atividade de hidrólise em meio orgânico para todos os preparados imobilizados foram menores que os obtidos para lipase purificada imobilizada em Accurel (Acc-LipC12) (TABELA 7). Este fato indica que, mesmo utilizando menores cargas de proteína, o suporte Accurel MP-1000 não foi seletivo para imobilizar somente LipC12 a partir do extrato bruto.

TABELA 11 - CARACTERIZAÇÃO DE ACC-EBLIPC12 COM DIFERENTES CARGAS DE PROTEÍNA

Carga de proteína inicial (mg g ⁻¹)	Eficiência de imobilização (E) (%) ^a	Massa de proteína imobilizada (mg g ⁻¹) ^b	Atividade em meio orgânico (U g ⁻¹) ^c
5	94	3,9	110 ± 0,5
10	93	8,3	160 ± 13
15	85	11	195 ± 12
20	69	11	206 ± 7
25	67	12	269 ± 12

Acc-EBLipC12: LipC12 imobilizada em Accurel MP-1000 a partir do extrato bruto.

a – Eficiência de imobilização calculada por diferença entre a atividade inicial e final no sobrenadante.

b – Proteína residual do sobrenadante determinada pelo método do ácido bicinconínico (BCA).

c – Hidrólise em meio orgânico: 5 mL de *n*-hexano, 70 mmol L⁻¹ trioleína, 2% de água (v/v), 20 mg de enzima imobilizada, 180 rpm, 40 °C. Teor de ácidos graxos residuais analisado pelo método de Lowry-Tinsley.

5.3.1.1 Atividade de esterificação e conversão em éster

Acc-EBLipC12 (300 mg g⁻¹) apresentou atividade de esterificação de 25 ± 0,4 U g⁻¹ e a conversão em éster foi de 81% em 5 h de reação, chegando a 97% em 7 h (FIGURA 26). Este resultado foi melhor que o encontrado para Acc-LipC12 (10 mg g⁻¹), em que foi obtida conversão de 86% em 7 h (18 U g⁻¹). No entanto, considerando que Acc-EBLipC12 ficou com uma carga de proteína final de 57 mg g⁻¹, esperava-se que seu desempenho fosse melhor.

Acc-EBLipC12 com as demais cargas de proteína estudadas (5 a 25 mg g⁻¹) não apresentou atividade de esterificação, o que confirmou que nem toda a proteína imobilizada era lipase, e a reduzida quantidade de lipase imobilizada não foi suficiente para realizar a catálise.

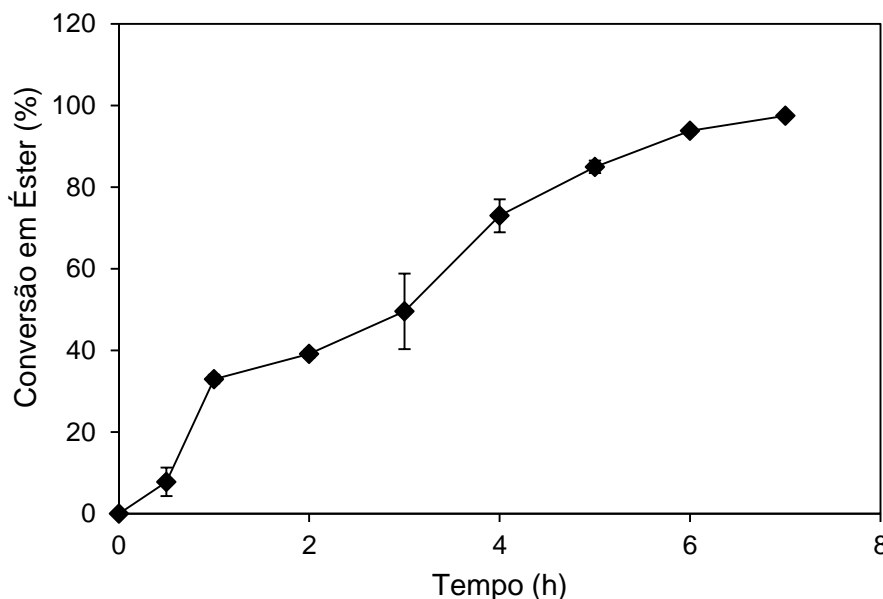


FIGURA 26 - SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA CATALISADA POR ACC-EBLIPC12

Acc-EBLipC12: LipC12 imobilizada em Accurel MP-1000 a partir do extrato bruto.

Condições: Meio reacional de 5 mL com 70 mmol L⁻¹ de ácido oleico, 210 mmol L⁻¹ de etanol em *n*-hexano; 110 mg de lipase imobilizada, 40 °C e 180 rpm. Teor de ácidos graxos residuais analisado pelo método de Lowry-Tinsley.

Estes resultados justificaram os estudos de imobilização de LipC12 em Immobead 150, que foram feitos para tentar promover a imobilização seletiva de LiC12 no suporte.

5.3.2 Imobilização e caracterização de LipC12 no Immobead 150 ativado e não ativado com Cu²⁺ a partir do extrato bruto

Segundo Mateo et al. (2000b), suportes que possuem grupos epóxido em sua estrutura, como o Immobead, apresentam algumas vantagens como maior estabilidade em longos períodos de estocagem e longos períodos de reação. Além disso, os grupos epóxido podem ser ativados com um metal, o qual pode interagir com a estrutura da lipase (geneticamente modificada) através da cauda His, promovendo assim uma purificação simultânea à imobilização (MATEO et al., 2001). Considerando estas características, estudos de imobilização no suporte Immobead ativado com Cu²⁺ (lbeadCu²⁺) e não ativado (lbead), utilizando EBLipC12 foram realizados.

A ativação do Immobead com íons Cu^{2+} foi realizada, seguindo o método proposto por Mateo et al. (2001) (4.2.2). EBLipC12 ficou em contato com Ibead Cu^{2+} e Ibead numa carga de proteína de 100 mg g^{-1} , durante 6 h, e mediu-se a atividade e o teor de proteína residuais no sobrenadante no início e final da imobilização. Entre os tempos de 3 e 6 h, a cinética de imobilização de LipC12 em ambos suportes não mudou; assim sendo, os dados da Figura 27 referem-se a imobilização por até 3 h. Pode-se observar que não houve diferença no perfil de desaparecimento da atividade e proteína do sobrenadante durante a imobilização do LipC12 em Ibead Cu^{2+} e Ibead a partir do extrato bruto, produzindo valores similares de eficiência de imobilização ($E=95\%$) nos dois casos.

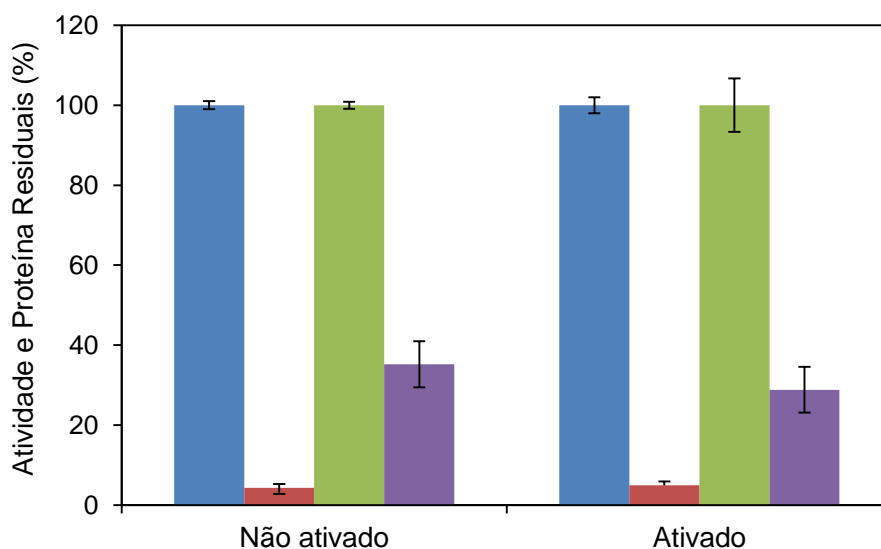


FIGURA 27 - IMOBILIZAÇÃO DE LIPC12 NO IMMOBEAD 150 ATIVADO E NÃO ATIVADO COM Cu^{2+} A PARTIR DO EXTRATO BRUTO

Legenda: (■) Atividade inicial 0 h; (■) Atividade residual em 3 h; (■) Proteína inicial 0 h; (■) Proteína residual em 3 h. Atividade residual: método titulométrico com trioleína, a 30°C e pH 7,5. Proteína residual: método do ácido bicinconínico (BCA).

A partir deste estudo de imobilização de LipC12 no Immobead, somente a atividade de esterificação (síntese do oleato de etila *n*-hexano, 4.3.1) foi avaliada para caracterização do preparado imobilizado e não mais a atividade de hidrólise. Optou-se pela reação de esterificação por dois motivos: 1) praticidade do método de esterificação e o maior interesse na aplicação de LipC12 imobilizada em reações de síntese; 2) reduzida atividade de hidrólise de preparados imobilizados no Immobead

causada pela formação de agregados, que provavelmente provocam limitações difusionais para o acesso do substrato hidrofóbico ao sítio ativo, conforme foi observado em 5.2.2.2.

A Figura 28 mostra que não houve diferença, tanto na conversão em éster como na atividade de esterificação, que foram de 93% em 2 h e 45 U g⁻¹, respectivamente, para ambos preparados enzimáticos.

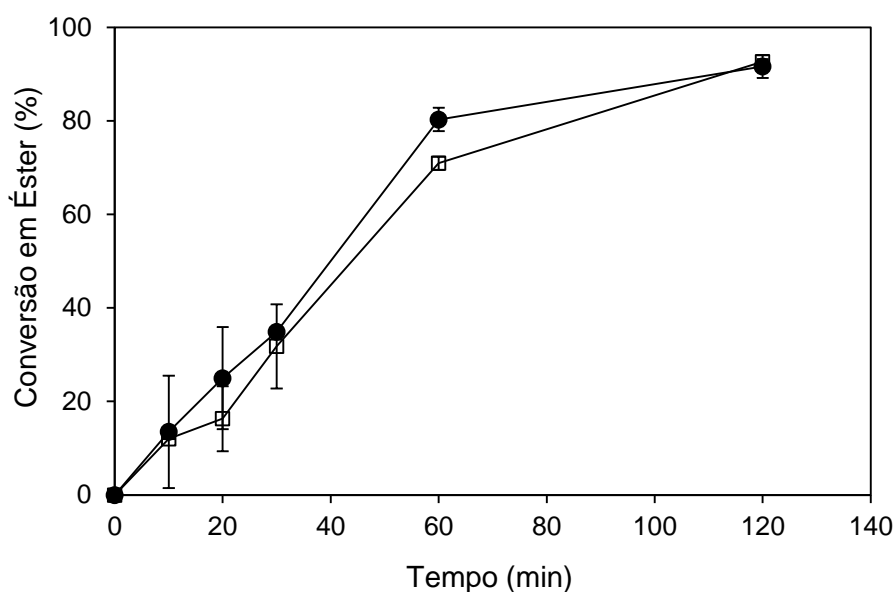


FIGURA 28 – SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA CATALISADA POR IBEADCu²⁺-EBLIPC12 E IBEAD-EBLIPC12

Legenda: (●) IbeadCu²⁺-EBLipC12 e (□) Ibead-EBLipC12.

IbeadCu²⁺-EBLipC12: LipC12 imobilizada no Immobead 150 ativado com Cu²⁺ a partir do extrato bruto. Ibead-EBLipC12: LipC12 imobilizada no Immobead 150 a partir do extrato bruto.

Condições: Meio reacional de 5 mL com 70 mmol L⁻¹ de ácido oleico, 210 mmol L⁻¹ de etanol em *n*-hexano; 110 mg de lipase imobilizada, 40 °C e 180 rpm. Teor de ácidos graxos residuais analisado pelo método de Lowry-Tinsley.

Com o resultado de atividade de esterificação concluiu-se que não havia necessidade de ativação prévia do Immobead para imobilizar LipC12. A imobilização no suporte Immobead envolve o ataque nucleofílico de grupos funcionais da proteína com grupos epóxido do suporte, sendo que os grupos mais reativos na superfície da proteína são as cadeias laterais desprotonadas de lisina, cisteína, histidina e tirosina (MATEO et al., 2007a). Assim, o fato de não ter havido diferença entre os suportes ativado e não ativado pode ser atribuído à interação entre os resíduos de histidina e os grupos epóxido do suporte. Em pH 7,5 (utilizado na imobilização), somente os

resíduos de histidina da cauda His vão estar desprotonados, uma vez que têm um pKa de 6,0 (QIAGEN, 1997), favorecendo a formação da ligação covalente direta entre os resíduos de histidina e o grupo epóxido do suporte. As outras cadeias laterais têm valores de pKa mais elevados (com base em aminoácidos livres, cisteína = 8,4, tirosina = 10,5 e lisina = 10,5) e, portanto, em pH 7,5, serão menos reativas.

Considerando os resultados desta etapa, Immobead sem ativação foi selecionado para dar continuidade aos estudos.

5.3.2.1 Estudo da carga de proteína ideal para imobilização

Com base nos resultados da Tabela 9, onde se mostra que o Immobead não estava saturado com carga de proteína de 10 mg g⁻¹, cargas de proteína acima de 50 mg g⁻¹ foram estudadas.

A performance dos preparados imobilizados foi avaliada através da síntese do oleato de etila. Com o aumento da carga de proteína de 50 para 400 mg g⁻¹, a eficiência de imobilização (E) diminuiu de 94 para 55% (TABELA 12). A conversão em éster após 60 min aumentou de 36% com uma carga de proteína de 50 mg g⁻¹, para mais de 98% para cargas de proteína de 200 mg g⁻¹ ou mais.

Ibead-EBLipC12 com carga de proteína de 200 mg g⁻¹ foi escolhida para a continuação dos estudos porque, além de ter apresentado alta atividade de esterificação (91 ± 8), o valor de E (72%) foi maior em relação às cargas de 300 e 400 mg g⁻¹ (E = 58 e 55%, respectivamente).

O suporte Immobead foi capaz de imobilizar maiores cargas de proteína que o Accurel provavelmente devido à elevada área superficial que apresenta, de 250 m² g⁻¹, enquanto que a área do Accurel MP-1000 é de 55,98 m² g⁻¹.

TABELA 12 - EFEITO DA CARGA DE PROTEÍNA NA EFICIÊNCIA DE IMOBILIZAÇÃO E NA ATIVIDADE DE LIPC12 IMOBILIZADA NO IMMOBEAD 150 A PARTIR DO EXTRATO BRUTO

Carga de proteína inicial (mg g ⁻¹)	Massa de proteína imobilizada (mg g ⁻¹) ^a	Eficiência de imobilização (E) (%) ^b	Atividade de esterificação (U g ⁻¹) ^c	Conversão em éster após 60 min (%)
50	40	94	15 ± 1	36
100	65	96	45 ± 2	71
200	100	72	91 ± 8	99
300	105	58	96 ± 4	99
400	112	55	93 ± 3	98

a - Proteína imobilizada no suporte determinada pela diferença entre o conteúdo inicial e final de proteína na solução enzimática determinada pelo método do ácido bicinonínico (BCA).

b – Eficiência de imobilização calculada por diferença entre a atividade inicial e final no sobrenadante.

c – Síntese do oleato de etila - Condições: Meio reacional de 5 mL com 70 mmol L⁻¹ de ácido oleico, 210 mmol L⁻¹ de etanol em *n*-hexano; 110 mg de lipase imobilizada, 40 °C e 180 rpm. Teor de ácidos graxos residuais analisado pelo método de Lowry-Tinsley.

5.3.2.2 Reutilização de Ibead-EBLipC12 em vários ciclos de esterificação

A estabilidade de Ibead-EBLipC12 (200 mg g⁻¹) frente a diferentes ciclos da síntese do oleato de etila (4.3.2) foi avaliada. Ibead-EBLipC12 permaneceu com 96% da sua atividade inicial após 10 ciclos de reação (FIGURA 29).

O rendimento de 99% em 1 h obtido quando se utilizou Ibead-EBLipC12 na síntese do oleato de etila em *n*-hexano é comparável a vários resultados descritos na literatura de reações de esterificação catalisadas por lipases imobilizadas na presença de solvente (TABELA 13). Porém, embora apresentem conversões elevadas, quase todas as reações envolvem tempos muito longos, de até 24 h. Os únicos resultados apresentados na Tabela 13 com conversões acima de 95% em 1 h na síntese de oleato de etila foram relatados por Martínez-Ruiz et al. (2008), que utilizaram o sólido fermentado da lipase de *R. oryzae* (ROL), e por Madalozzo et al. (2014), para ROL expressa em *Pichia pastoris* imobilizada em Accurel MP-1000. Portanto, os resultados do presente trabalho são particularmente promissores, uma vez que mostraram que

as altas conversões podem ser mantidas por mais de 10 ciclos de reação de 1 h, enquanto que os dois estudos citados anteriormente não relataram resultados de reutilização do biocatalisador.

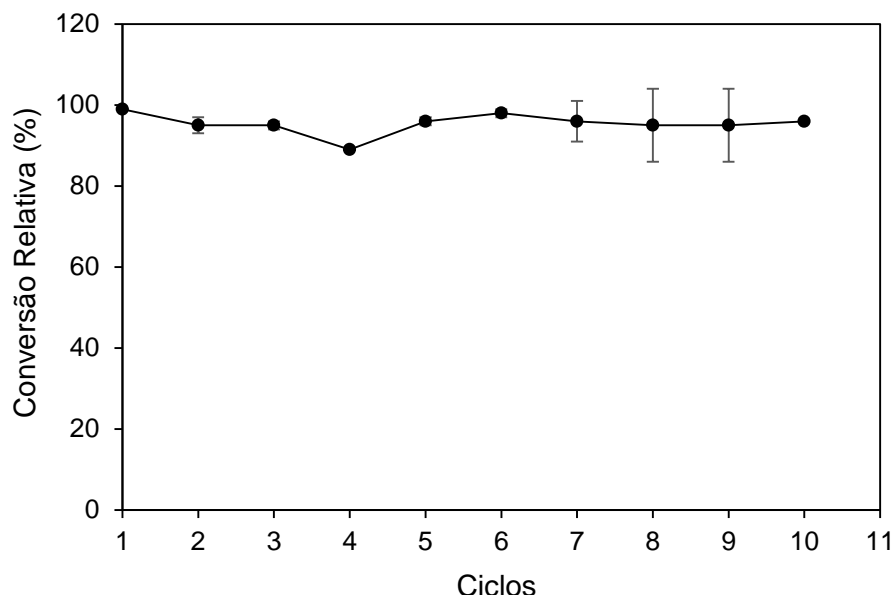


FIGURA 29 - ESTABILIDADE DE IBEAD-EBLIPC12 FRENTE A VÁRIOS CICLOS DE REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO

Condições: Meio reacional de 5 mL com 70 mmol L⁻¹ de ácido oleico, 210 mmol L⁻¹ de etanol em *n*-hexano, 110 mg de lipase imobilizada, 40 °C, 180 rpm. Teor de ácidos graxos residuais analisado pelo método de Lowry-Tinsley.

O processo de imobilização do EBLipC12 e sua aplicação em reações de esterificação oferecem duas principais vantagens. Em primeiro lugar, não é necessário realizar as etapas de remoção da cauda-His, que poderia criar complicações, tais como clivagens não específicas, remoção parcial da cauda His e a adição de proteases contaminantes à preparação (HORCHANI et al., 2009). Em segundo lugar, uma vez que se obteve um bom desempenho na imobilização diretamente a partir do EB, não só os custos extras de processamento foram evitados, mas também perdas de atividade, que são muitas vezes inevitáveis em etapas de cromatografia de coluna.

TABELA 13 – REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO CATALISADAS POR LIPASES (CONTINUA)

Lipase fonte/suporte	Éster	Solvente	Concentração de substratos	Lipase (mg mL ⁻¹)	Conversão em éster (%)	Tempo (h)	Ciclos ^a	Referência
Ibead-EBLipC12/ Immobead 150	Oleato de etila	<i>n</i> -hexano (96%)	70 mmol L ⁻¹ ácido oleico 210 mmol L ⁻¹ etanol	22 (110/5)	99	1	10	Este trabalho
(Metagenômica) LipG9/Accurel MP-1000	Oleato de etila	<i>n</i> -heptano (96%)	70 mmol L ⁻¹ ácido oleico 210 mmol L ⁻¹ etanol	20* (100/5)	95	7	ND	(ALNOCH et al., 2015)
<i>Staphylococcus warneri</i> EX17/Immobead 150	Butirato de etila	<i>n</i> -hexano (98%)	100 mmol L ⁻¹ ácido butírico 100 mmol L ⁻¹ etanol	6,83 (68,3/10)	6	24	ND	(ABREU et al. 2014)
<i>Rhizopus oryzae</i> (recombinante)/ Accurel MP-1000	Oleato de etila	<i>n</i> -heptano (98%)	56 mmol L ⁻¹ ácido oleico 168 mmol L ⁻¹ etanol	10 (100/10)	93	1	ND	(MADALOZZO et al., 2014)
<i>Thermomyces lanuginosus</i> / PHB	Oleato de etila	<i>n</i> -heptano (6%)	2500 mmol L ⁻¹ ácido oleico 2500 mmol L ⁻¹ etanol	160 (1600/10)	90	0,25	5	(MIRANDA et al. (2014)
<i>Rhizopus oryzae</i> (recombinante)/ Eupergit C	Butirato de etila	iso-octano (98%)	100 mmol L ⁻¹ ácido butírico 125 mmol L ⁻¹ etanol	6,45* (64,5/10)	99	24	0	(GUILLÉN et al., 2012)
CALB/resina acrílica	Acetato de butila	<i>n</i> -hexano (98%)	100 mmol L ⁻¹ ácido acético 100 mmol L ⁻¹ butanol	0,48* (4,8/10)	90	2.5	1	(MARTINS et al., 2011)

TABELA 13 – REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO CATALISADAS POR LIPASES (CONCLUSÃO)

Lipase fonte/suporte	Éster	Solvente	Concentração de substratos	Lipase (mg mL ⁻¹)	Rendimento em éster (%)	Tempo (h)	Ciclos ^a	Referência
CALB/resina acrílica	Palmitato de metila	iso-octano (88%)	360 mmol L ⁻¹ ácido palmítico 432 mmol L ⁻¹ metanol	4 (40/10)	98	3	50	(TALUKDER et al., 2010)
<i>Staphylococcus aureus</i> (recombinante)/CaCO ₃	Oleato de butila	<i>n</i> -hexano (96%)	100 mmol L ⁻¹ ácido oleico 100 mmol L ⁻¹ butanol	22,5* (90/4)	17	24	ND	(HORCHANI et al., 2009)
<i>Candida rugosa</i> / Quitosana	Oleato de butila	iso-octano (100%)	100 mmol L ⁻¹ ácido oleico 100 mmol L ⁻¹ butanol	0,93 (70/75)	50	6	ND	(ORREGO et al., 2009)
<i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11/ Accurel MP-1000	Oleato de etila	<i>n</i> -heptano (96%)	70 mmol L ⁻¹ ácido oleico 210 mmol L ⁻¹ etanol	90 (450/5)	100	3	11	(SALUM et al., 2008)
<i>Rhizopus oryzae</i> /sólido fermentado	Oleato de etila	<i>n</i> -hexano (97%)	50 mmol L ⁻¹ ácido oleico 250 mmol L ⁻¹ etanol	111 (1000/9)	100	1	ND	(MARTINEZ-RUIZ et al., 2008)

CALB: Lipase B de *Candida antarctica* (Novozymes 435); PHB: partículas de poli-hidroxibutirato.

a- Número de ciclos de reação de esterificação no qual a preparação imobilizada mantém sua atividade original.

ND – não determinada pelo autor.

*Massa de lipase imobilizada utilizada nas reações calculada a partir da atividade (U mg⁻¹) da proteína imobilizada no suporte, ou % de lipase imobilizada adicionada no meio reacional em relação à massa total de substratos.

5.3.3 Influência de diferentes condições de imobilização de LipC12 em Immobead

150

Quando suportes contendo grupos epóxido como o Immobead são usados, as condições de imobilização influenciam as propriedades da enzima. De acordo com Mateo et al. (2000b), as ligações entre os grupos epóxido do suporte e os grupos nucleofílicos da proteína tornam-se mais numerosas conforme aumenta-se o tempo de incubação e o pH da solução oferecida para imobilização, produzindo ligações covalentes multipontuais. Isto ocorre porque, com o aumento do pH, a reatividade dos resíduos de lisina na proteína também aumenta, pois estes se tornam desprotonados, favorecendo a ligação covalente multipontual.

Até esta etapa do trabalho, o pH 7,5 vinha sendo utilizado durante a imobilização e conforme relatado em 5.3.2, esta condição pode favorecer a reatividade dos resíduos de histidina com os grupos epóxido do suporte. Portanto, para avaliar se outras condições de imobilização, teriam influência no aumento da atividade de Ibead-EBLipC12 nas reações de esterificação, novos ensaios de imobilização foram realizados utilizando tempos de imobilização de até 24 h, com aumento do pH para 8,5 (TABELA 14).

Além disso, os preparados imobilizados por 24 h a pH 8,5 foram incubados em duas diferentes condições: a pH 10,0 por 24 h, para favorecer a reatividade resíduos de lisina na proteína e por 24 h em solução de glicina 3 M para bloquear os grupos epóxido que não reagiram com a proteína (MATEO et al., 2003). Os grupos epóxi podem ser facilmente bloqueados através da reação com grupos tiol (β -mercaptoetanol) ou amina (glicina), e isso impedirá maiores interações entre o suporte e a enzima que poderiam diminuir sua estabilidade (MATEO et al., 2000a).

Verificou-se que, em condições de imobilização mais agressivas, como aumento do tempo de incubação e do pH (condições 5 e 6, Tabela 14), a massa de proteína incorporada no suporte aumentou, mas que, nestas condições, há uma diminuição da atividade enzimática de esterificação. A eficiência de imobilização (E) foi similar (68 a 72%) para todas as condições estudadas, mas a massa de proteína imobilizada foi 20% maior quando EBLipC12 foi imobilizada a pH 8,5, por 24 h (TABELA 14). Isto indica que o maior tempo de imobilização pode ter promovido o

aumento do número de ligações covalentes, o que está de acordo com o que foi descrito por Mateo et al. (2000a).

Para determinar o teor de proteína que havia sido imobilizado covalentemente ao suporte, foi feito um procedimento que promove a dessorção das proteínas aderidas por interação física por lavagem dos preparados imobilizados com solução contendo SDS 2% (m/v), conforme descrito em 4.2.2. Para todas as condições de imobilização, o percentual de proteína lixiviado do suporte foi muito pequeno, entre 1,5 a 4% (condição 1, TABELA 14). Isto significa que, mesmo que a imobilização ocorra em pH 7,5 e 3 h, as proteínas de EBLipC12 são em sua maioria imobilizadas por ligação covalente.

TABELA 14 – IMOBILIZAÇÃO DE LIPC12 EM IMMOBEAD 150 A PARTIR DO EXTRATO BRUTO SOB DIFERENTES CONDIÇÕES

Condição	pH ^a	Tempo (h) ^b	E (%) ^c	Massa de proteína imobilizada (mg g ⁻¹) ^d	Proteína lixiviada do suporte após fervura em SDS (%) ^e	Atividade de esterificação (U g ⁻¹) ^f	Conversão em éster após 60 min (%)
1	7,5	3	72	100	4,0	140 ± 14	95
2	8,5	3	68	100	2,5	154 ± 8	96
3	8,5	6	70	100	3,0	157 ± 4	96
4	8,5	24	71	120	2,0	155 ± 12	93
5	10,0*	24	71	120	1,5	86 ± 15	91
6	GLC 3 M pH 8,5*	24	71	120	2,0	84 ± 12	91

Carga de proteína inicial utilizada nos ensaios: 200 mg g⁻¹.

*A enzima imobilizada foi incubada por 24 h a pH 8,5 para imobilização e em seguida permaneceu por mais 24 h nas condições citadas na tabela.

a – pH do tampão Tris HCl 50 mmol L⁻¹ ou tampão glicina 50 mmol L⁻¹ utilizado nas imobilizações.

b – Tempo de incubação.

c – Eficiência de imobilização calculada por diferença entre a atividade inicial e final no sobrenadante.

d - Proteína imobilizada no suporte determinada pela diferença entre o conteúdo inicial e final de proteína na solução enzimática determinada pelo método do ácido bicinonínico (BCA).

e - A proteína liberada do Immobead 150 pela fervura das preparações imobilizadas na presença de SDS 2% por 30 min e determinada pelo método do ácido bicinonínico (BCA).

f - Síntese do oleato de etila - Condições: Meio reacional de 5 mL com 70 mmol L⁻¹ de ácido oleico, 210 mmol L⁻¹ de etanol em *n*-hexano; 110 mg de lipase imobilizada, 40 °C e 180 rpm. Teor de ácidos graxos residuais analisado pelo método de Lowry-Tinsley.

A síntese do oleato de etila catalisada pela lbead-EBLipC12 preparada sob diferentes condições também foi avaliada e, para todas as preparações imobilizadas, a conversão em éster após 60 min foi maior que 90% (entre 91 e 96%) (TABELA 14). No entanto, os preparados imobilizados sob as condições 5 e 6 (TABELA 14) apresentaram velocidade inicial de reação muito menor, o que rendeu atividades de esterificação em torno de 60% mais baixas que para as outras condições estudadas.

A cinética das reações está representada na Figura 30, onde a menor conversão em éster lbead-EBLipC12 imobilizada nas condições 5 e 6 pode ser observada. O aumento do número de ligações multipontuais, formadas quando maiores valores de pH e maior tempo de incubação foram utilizados, podem ter influenciado na atividade de esterificação de lbead-EBLipC12. Estas ligações podem ser formadas através de vários grupos, como, por exemplo, os grupos amino, sulfidril, hidroxila e alguns grupos fenólicos, os quais poderiam ser essenciais para a atividade da enzima e podem promover mudanças na estrutura da lipase, causando sua desnaturação. Além disso, pela existência de ligações multipontuais, o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima pode ser dificultado, causando uma diminuição na velocidade inicial da reação (KNEZEVIC et al., 2006).

Nestes experimentos, o procedimento utilizado na reação de esterificação foi levemente diferente daquele utilizado na Tabela 12, porque os melhores parâmetros desta reação foram estudados e a melhor condição desta reação foi encontrada, promovendo assim maior atividade da lipase imobilizada. Estes resultados estão descritos a seguir em 5.4.1.

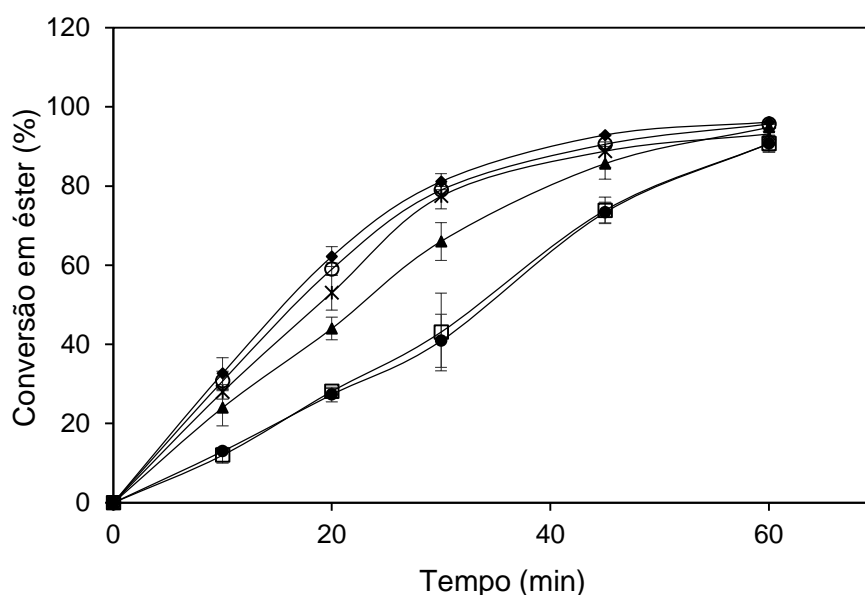


FIGURA 30 – CONVERSÃO EM ÉSTER NA REAÇÃO DE SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA CATALISADA POR LIPC12 IMOBILIZADA EM IMMOBEAD 150 A PARTIR DO EXTRATO BRUTO SOB DIFERENTES CONDIÇÕES

Legenda: (▲) pH 7,5, 3 h; (○) pH 8,5, 3 h; (◆) pH 8,5, 6 h; (*) 8,5, 24 h; (□) pH 8,5, 24 h + incubação pH 10,0 e (●) pH 8,5, 24 h + incubação em glicina 3 mol L⁻¹, pH 8,5.

Condições: meio reacional de 5 mL com 70 mmol L⁻¹ de ácido oleico, 210 mmol L⁻¹ de etanol em *n*-hexano; 110 mg de lipase imobilizada, 40 °C e 180 rpm. Teor de ácidos graxos residuais analisado pelo método de Lowry-Tinsley.

A modificação das condições de imobilização estudadas nessa etapa do trabalho não promoveu um aumento significativo nas cargas de proteína imobilizadas por ligação covalente. Também não houve aumento na atividade de esterificação e conversão em éster. Portanto, a imobilização EBLipC12 em Immobead continuou a ser realizada nas condições utilizadas anteriormente, em pH 7,5 com 3 h de incubação.

5.4 CARACTERIZAÇÃO DE LIPC12 IMOBILIZADA NO IMMOBEAD 150 A PARTIR DO EXTRATO BRUTO

Nesta etapa do trabalho, lbead-EBLipC12 foi caracterizada utilizando como modelo a reação de síntese do oleato de etila em *n*-hexano e, por isso, esta reação foi otimizada.

5.4.1 Efeito da massa de enzima imobilizada na reação de esterificação

Primeiramente, foi avaliado o efeito da quantidade de Ibead-EBLipC12 no meio reacional, utilizando massas de 20, 50 e 80 mg, além de 110 mg, que já vinha sendo utilizada nas reações anteriores. Alguns autores relatam que a velocidade e o rendimento da reação são proporcionais à quantidade de catalisador (GHAMGUI et al., 2007). A velocidade da reação é maior quanto maior a quantidade de catalisador. No entanto, quanto menor a quantidade de enzima utilizada em reações de síntese, maior pode ser a produtividade, que leva em consideração o rendimento da reação por massa de catalisador e pelo tempo ($\text{mg g}^{-1} \text{h}^{-1}$). Na Figura 31A, pode-se observar que, em 60 min, a conversão em éster chegou a 94% e 88% utilizando 110 e 80 mg de enzima imobilizada, respectivamente. Quando se utilizou 50 mg de biocatalisador a conversão chegou a 90% em 90 min, e com 20 mg de biocatalisador a reação demorou 120 min para alcançar uma conversão de 49% em éster.

A quantidade de 50 mg de Ibead-EBLipC12 foi escolhida para o estudo dos demais parâmetros, visto que uma alta conversão (90%) aconteceu de forma relativamente rápida (90 min).

5.4.2 Efeito da temperatura na reação de esterificação

A temperatura pode afetar consideravelmente a velocidade de reação catalisada por enzimas por dois mecanismos distintos: (1) o mecanismo químico, onde a velocidade da reação aumenta com a temperatura pelo aumento da energia cinética dos reagentes (substratos) e também pelo aumento da transferência de massa; (2) o mecanismo associado à desnaturação da enzima com a alta temperatura (AL-ZUHAIR et al., 2007; NOUREDINI et al., 2005; FUKUDA et al., 2001). No presente trabalho, estudou-se o efeito de temperaturas entre 30 e 60 °C na síntese do oleato de etila em *n*-hexano. Os resultados apresentados na Figura 31B mostram que não houve diferença na conversão em éster utilizando temperaturas de 40 e 50 °C, nas quais a conversão chegou em torno de 90% em 90 min. Já com temperaturas de 30 e 60 °C, a conversão em éster chegou a 75% e 21% em 90 min, respectivamente.

Assim sendo, a temperatura de 40 °C, que já vinha sendo utilizada nas reações de esterificação até esta etapa do trabalho, continuou a ser utilizada.

5.4.3 Efeito da agitação na reação de esterificação

A transferência de massa e a mistura dos reagentes podem ser influenciadas pela agitação do meio reacional. Portanto, o efeito da agitação na síntese do oleato de etila também foi estudado. Agitações de 180, 250 e 300 rpm foram utilizadas, sendo que as maiores conversões em éster foram observadas com 250 e 300 rpm (95% em 90 min) (FIGURA 31C). Segundo Pencreatch, Leullier e Baratti (1997), quanto maior a agitação do meio reacional, maior é solubilidade dos substratos no meio reacional e maior é a atividade da lipase imobilizada. Isto deve-se principalmente ao acesso facilitado do substrato no interior dos poros do suporte, alcançando o sítio ativo da enzima.

A partir dos resultados desta etapa, concluiu-se que os parâmetros que apresentaram maior diferença em relação às condições utilizadas nos ensaios anteriores foram agitação e a massa de enzima no meio reacional. Assim sendo, as condições de síntese do oleato de etila escolhidas para os próximos experimentos foram: temperatura de 40 °C, agitação de 250 rpm e 80 mg de biocatalisador. A massa de biocatalisador de 80 mg foi selecionada porque o objetivo era a obtenção de no mínimo 90% de conversão em éster em no máximo 60 min durante a caracterização do biocatalisador. Isto não seria possível utilizando-se 50 mg de biocatalisador no meio reacional, visto que com esta massa de biocatalisador a conversão chegou a 88% em 90 min.

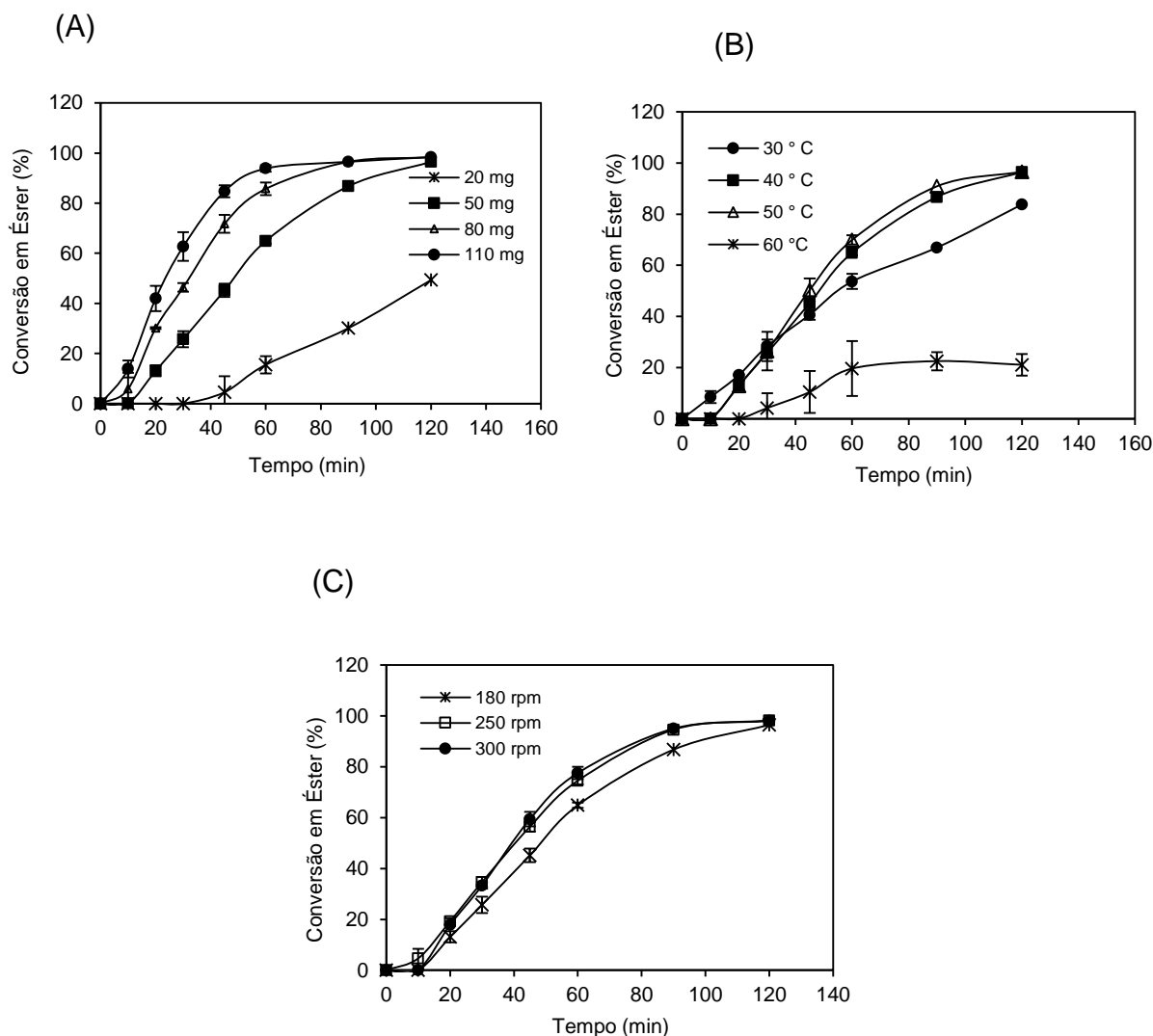


FIGURA 31 - EFEITO DA QUANTIDADE DE IBEAD-EBLIPC12 (A) TEMPERATURA (B) E AGITAÇÃO (C) NA SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA

Ibead-EBLipC12: LipC12 imobilizada no Immobead 150 (200 mg g⁻¹).

Condições: meio reacional de 5 mL com 70 mmol L⁻¹ de ácido oleico, 210 mmol L⁻¹ de etanol em *n*-hexano. Teor de ácidos graxos residuais analisado pelo método de Lowry-Tinsley.

5.4.4 Estabilidade ao armazenamento

Ibead-EBLipC12 permaneceu armazenada a -18 °C por 6 meses e sua atividade de esterificação foi medida mensalmente. A temperatura de -18 °C foi escolhida para este estudo porque se verificou perda de em torno 30% da atividade quando Ibead-EBLipC12 foi armazenada por 1 mês a 4 °C (dados não mostrados). Pode-se observar na Figura 32 que a lipase imobilizada manteve-se estável até o 4°

mês, com queda da atividade (23%) a partir do 5º mês. Geralmente, as enzimas mantêm a atividade quando conservadas em baixas temperaturas, provavelmente porque tendem a manter sua estrutura original. Outro fator que favorece a manutenção da atividade da enzima durante o armazenamento, é o fato de estar imobilizada, pois provavelmente as interações da enzima com suporte evitam qualquer processo intermolecular como proteólise e agregação (BASRI et al., 1994). Porém, a umidade pode influenciar na perda de atividade da enzima, pois a presença de água no material pode levar ao crescimento microbiano e à desnaturação da proteína (RÜKOLD, GROBECKER e ISENGARD, 2001). Apesar de Ibead-EBLipC12 ter sido armazenada em um tubo tipo Falcon vedado com uma película flexível de ação aderente (Parafilm), a abertura mensal do recipiente pode ter favorecido a entrada de umidade, o que provocou perda da atividade a partir do 5º mês.

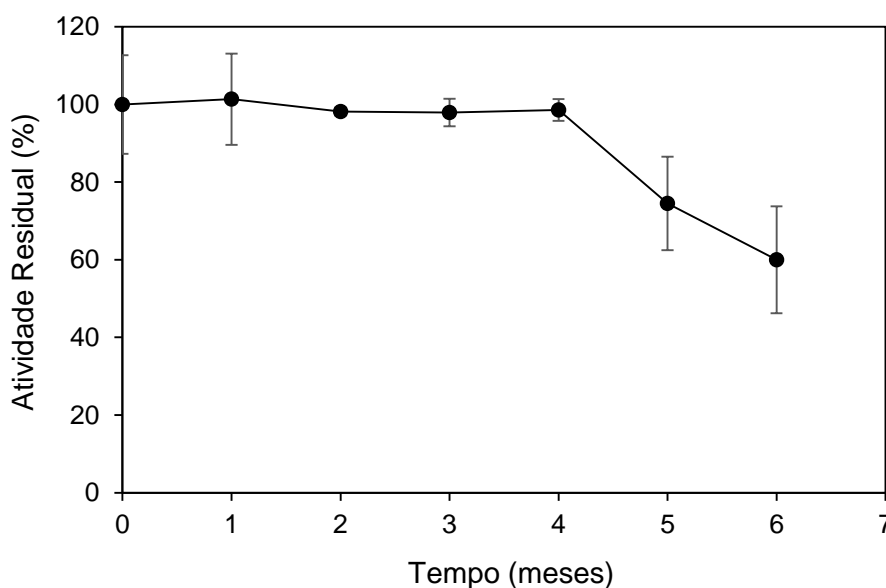


FIGURA 32 - ESTABILIDADE DE IBEAD-EBLIPC12 DURANTE ARMAZENAMENTO A -18 °C

Síntese do oletato de etila - Condições: meio reacional de 5 mL com 70 mmol L⁻¹ de ácido oleico, 210 mmol L⁻¹ de etanol em *n*-hexano, 80 mg de lipase imobilizada, 40 °C, 250 rpm. Teor de ácidos graxos residuais analisado pelo método de Lowry-Tinsley.

5.4.5 Estabilidade em solventes orgânicos

Solventes orgânicos hidrofóbicos podem ser utilizados como solventes em reações de síntese com o objetivo de solubilizar os substratos, aumentar a termoestabilidade da enzima e favorecer o equilíbrio da reação em direção à síntese (OGINO, 2008). Solventes hidrofílicos, como álcoois, geralmente atuam como reagentes em reações de síntese e por isso também foram utilizados neste estudo.

A natureza do solvente orgânico é um fator importante a ser considerado na catálise enzimática em meio não aquoso, pois o solvente pode afetar a atividade e a estabilidade da enzima. Os solventes hidrofóbicos são menos nocivos à enzima, pois interagem menos com a água de hidratação necessária para manter a enzima cataliticamente ativa. Solventes hidrofílicos contêm maior quantidade de grupos polares e tendem a retirar a água de hidratação da enzima, acarretando a perda da atividade enzimática (FABER, 2004). Além disso, com menor tamanho da molécula, o metanol e etanol, por exemplo, podem penetrar mais facilmente no sítio ativo da enzima, promovendo a inibição da atividade (NOUREDDINI; GAO; PHILKANA, 2005). Os resultados de estabilidade de Ibead-EBLipC12 em solventes (TABELA 15) estão de acordo com esta informação.

Os resultados apresentados na Tabela 15 mostram que, na presença dos solventes iso-octano, *n*-heptano, *n*-hexano e tolueno, Ibead-EBLipC12 manteve em torno de 90% de sua atividade mesmo após 24 h de incubação a 40 °C. Já em relação aos solventes hidrofílicos, observou-se uma redução da atividade com o aumento da polaridade dos solventes, sendo que esta perda foi mais acentuada após incubação em metanol (99%) durante 24 h (TABELA 15). Conforme relatado no parágrafo anterior, pode ter ocorrido a desnaturação da enzima ou inibição competitiva pelo metanol. A maior perda de atividade após ser incubada em metanol também ocorreu para a lipase de metagenômica LipG9 imobilizada em Accurel MP-1000, a qual perdeu 70% da atividade após incubação neste solvente durante 8 h a 30 °C (ALNOCH et al., 2015).

TABELA 15 - ESTABILIDADE DE IBEAD-EBLIPC12 EM SOLVENTES ORGÂNICOS

Solvente	Log <i>P</i>	Atividade Residual (%)			
		0h	1 h	12 h	24 h
Metanol	-0,77	100	5 ± 1	3	1
Etanol	-0,23	100	70 ± 8	62 ± 2	55 ± 6
Iso-propanol	0,16	100	78 ± 3	67 ± 9	59 ± 6
Propanol	0,25	100	96 ± 3	91 ± 3	92 ± 1
Butanol	0,80	100	98 ± 1	95 ± 3	95 ± 3
Tolueno	2,50	100	99	94	95 ± 1
<i>n</i> -Hexano	3,50	100	93 ± 4	89	88 ± 3
<i>n</i> -Heptano	4,00	100	100	93 ± 3	90 ± 4
Iso-octano	4,78	100	97 ± 3	96 ± 3	97 ± 2

A atividade da enzima sem incubação foi considerada 100%.

Condições de incubação: 80 mg de Ibead-EBLipC12 incubada em 3 mL de cada solvente sob agitação de 250 rpm, 40 °C.

Condições da reação: meio reacional de 5 mL com 70 mmol L⁻¹ de ácido oleico, 210 mmol L⁻¹ de etanol em *n*-hexano, 80 mg de lipase imobilizada, 40 °C e 250 rpm. Teor de ácidos graxos residuais analisado pelo método de Lowry-Tinsley.

Glogauer et al. (2011) relataram que LipC12 purificada na forma livre apresentou o fenômeno de ativação (aumento de atividade) após ser incubada em soluções aquosas com 15 e 30% de solventes hidrofílicos e hidrofóbicos a 4 °C durante 48 h. Os autores associam a ativação à *lid*, presente na estrutura de LipC12, que poderia mudar da conformação fechada para aberta na presença do solvente. Porém, os resultados de Glogauer et al. (2011) são de difícil comparação com os do presente trabalho, visto que no presente trabalho a lipase está na forma imobilizada e foi incubada nos solventes puros a 40 °C por até 24 h.

5.4.6 Estabilidade à temperatura

A temperatura pode influenciar positivamente na velocidade da reação e negativamente na estabilidade da enzima e é por isso que, a investigação do seu

efeito sobre a estabilidade da enzima é sempre recomendada para selecionar qual a melhor temperatura a ser utilizada em reações de síntese. A incubação da enzima em diferentes temperaturas por períodos mais prolongados prediz seu comportamento em reações de síntese em sistemas livres ou parcialmente livres de solvente, as quais geralmente exigem um maior tempo de reação. Sendo assim, a estabilidade de Ibead-EBLipC12 foi estudada incubando-a em *n*-hexano em diferentes temperaturas por até 24 h sob agitação de 250 rpm. Os resultados apresentados na Figura 33 mostram que a lipase se manteve estável em todas as temperaturas estudadas, permanecendo com 95% da sua atividade inicial após incubação nas temperaturas de 30 e 40 °C, 85% em 50 °C e 70% após 24 h a 60 °C. Na forma livre, LipC12 permaneceu com 100% da atividade após incubação em temperaturas de até 50 °C e com 76% após incubação a 60 °C. Entretanto, estes ensaios descritos por Glogauer et al. (2011), foram realizados incubando-se a enzima em tampão (Tris-HCl 50 mmol L⁻¹ pH 7,5, 5 mmol L⁻¹ de CaCl₂) por apenas 1 h em cada temperatura.

Na maioria dos estudos que relatam a termoestabilidade de lipases imobilizadas, a enzima é incubada por períodos menores que 12 e 24 h, que foram utilizados neste trabalho. Alguns autores que utilizaram suportes com características semelhantes ao Immobead, relataram perda da atividade da enzima em altas temperaturas, mesmo utilizando menores tempos de incubação. Este é o caso de Knezevic et al. (2006), que verificaram a perda de 70% da atividade da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em Eupergit C, após 10 h de incubação a 50 °C. No entanto, a lipase de *Talaromyces thermophilus* imobilizada em quitosana (ligação covalente) manteve em torno de 90% da sua atividade após incubação de 1 h a 60 °C e 78% após incubação a 70 °C (ROMDHANE et al., 2010).

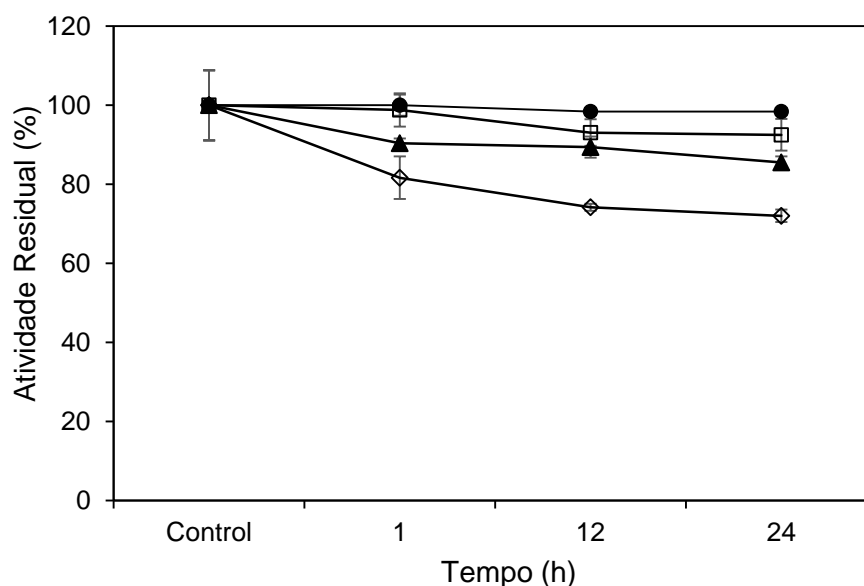


FIGURA 33 - ESTABILIDADE DE IBEAD-EBLIPC12 EM DIFERENTES TEMPERATURAS

Legenda: (□) 30 °C; (●) 40 °C; (▲) 50 °C; (◇) 60 °C.

Condições de incubação: 80 mg de Ibead-EBLipC12 em 3 mL de *n*-hexano sob agitação de 250 rpm. Condições da reação: meio reacional de 5 mL com 70 mmol L⁻¹ de ácido oleico, 210 mmol L⁻¹ de etanol em *n*-hexano, 80 mg de lipase imobilizada, 40 °C e 250 rpm. Teor de ácidos graxos residuais analisado pelo método de Lowry-Tinsley.

5.4.7 Determinação da Regiosseletividade

A avaliação da regiosseletividade ou especificade posicional de uma lipase é importante principalmente para verificar a possibilidade de sua utilização na modificação de lipídios para fins nutracêuticos. Lipases *sn*-1,3 específicas são as mais utilizadas pois mimetizam a lipase pancreática que hidrolisa o triacilglicerol nas posições *sn*-1 e *sn*-3, sendo que lipídios modificados nestas posições possuem maior aplicabilidade quando se trata de alimentos nutracêuticos, pois podem ser absorvidos mais facilmente e ter seu conteúdo calórico reduzido (JENNINGS e AKOH, 2001).

A regiosseletividade de Ibead-EBLipC12 foi avaliada a partir dos produtos obtidos após 5 min de reação de hidrólise da trioleína em meio orgânico (4.4.3). Os produtos da hidrólise são ácido oleico, 1 (2)-monoleína, 1,2 (2,3)-dioleína e parte da trioleína não hidrolisada, os quais foram identificados por cromatografia de camada delgada (4.6.6). O produto 1,3-dioleína não apareceu entre os produtos da reação, conforme pode ser observado na Figura 34, indicando que Ibead-EBLipC12 é *sn*-1,3

específica. A ausência do produto 1,3-dioleína também mostra que não ocorreu a acil-migração, que é modificação aleatória e independente dos ácidos graxos presentes no triacilglicerol (YANG, FRUEKILDE e XU, 2005), provavelmente devido ao curto período da reação (5 min).

Watanabe et al. (2003) sugeriram que a enzima pode ser *sn*-1,3 específica, mas que alguns fatores podem promover a acil-migração durante a reação, tais como o longo tempo de reação, altas temperaturas e alta carga de enzima imobilizada. Estes autores estudaram a produção de *sn*-1,3 diacilglicerol a partir de uma mistura de ácidos graxos e glicerol utilizando a lipase de *Rhizomucor mihei* em sistema livre de solvente e relataram que o aumento da quantidade de biocatalisador no meio reacional pode ter provocado a acil-migração dos ácidos graxos das posições *sn*-1 e *sn*-3 para a posição *sn*-2 do diacilglicerol. Os autores chegaram a esta conclusão porque houve uma redução de 26% do produto quando a quantidade de lipase no meio reacional foi aumentada de 2,5 para 20%.

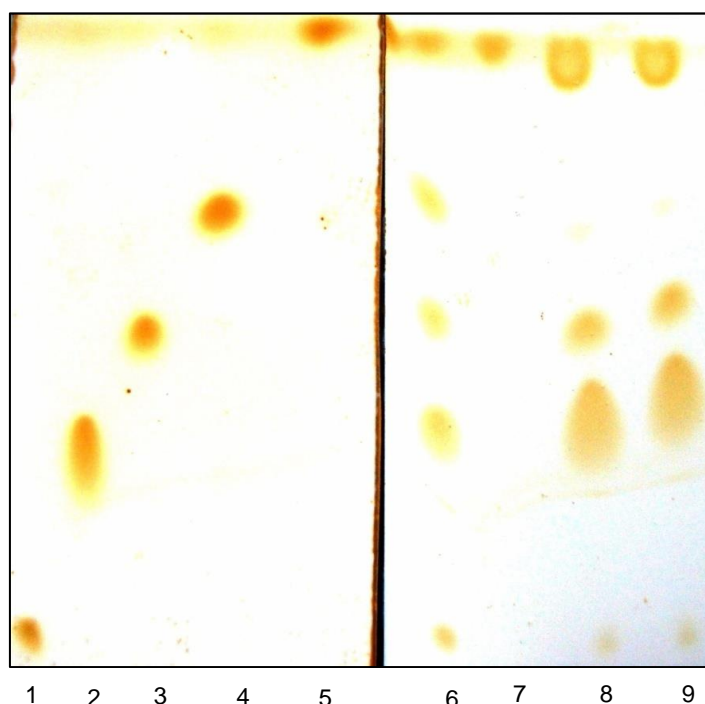


FIGURA 34 - AVALIAÇÃO DA REGIOSSELETIVIDADE DE IBEAD-EBLIPC12

Legenda: (1) 1(2)-monoleína; (2) ácido oleico; (3) 1,2 (2,3)-dioleína; (4) 1,3-dioleína; (5) trioleína; (6) mistura dos padrões; (7) trioleína; (8) e (9) produtos da hidrólise da trioleína catalisada por Ibead-EBLipC12.

Hidrólise em meio orgânico: meio reacional de 5 mL com 70 mmol L⁻¹ trioleína e 2% de água em *n*-hexano, 20 mg de lipase imobilizada, 200 rpm e 40 °C. Teor de ácidos graxos residuais analisado pelo método de Lowry-Tinsley.

5.4.8 Determinação da Tiposseletividade

O efeito do tamanho da cadeia de ácido graxo na atividade de Ibead-EBLipC12 (tiposseletividade) foi avaliado através de reações de esterificação, utilizando ácidos graxos de diferentes comprimentos de cadeia e graus de saturação. O conhecimento da tiposseletividade de uma enzima em meio orgânico é importante para definir o tipo de reação que é mais favorável para sua aplicação em biocatálise.

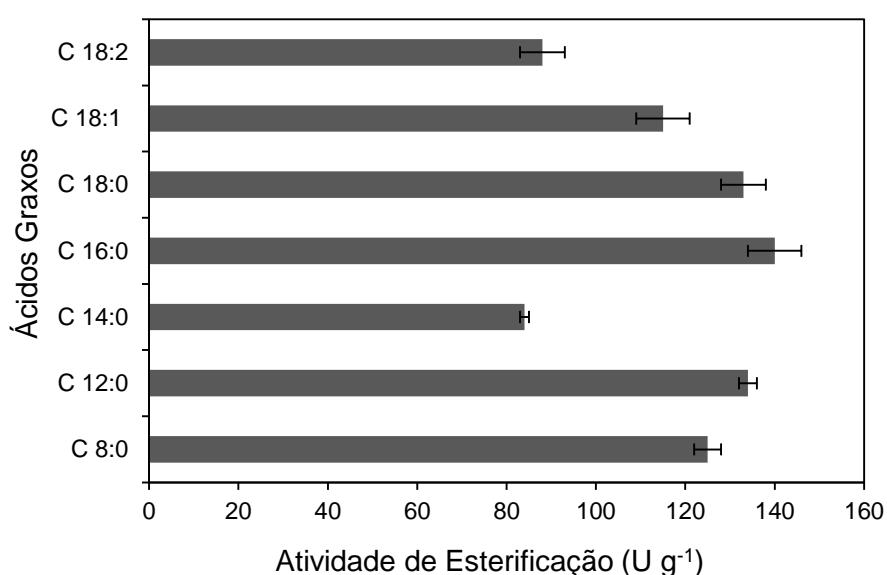


FIGURA 35 - ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO DE IBEAD-EBLIPC12 FRENTE A ÁCIDOS GRAXOS DE DIFERENTES TAMANHOS DE CADEIA E GRAUS DE SATURAÇÃO

Condições: meio reacional de 5 mL com 70 mmol L⁻¹ de ácido graxo, 210 mmol L⁻¹ de etanol em *n*-hexano, 80 mg de lipase imobilizada, 40 °C e 250 rpm. Teor de ácidos graxos residuais analisado pelo método de Lowry-Tinsley.

As maiores atividades foram obtidas para os ácidos saturados palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), seguindo-se o ácido láurico (C12:0), sendo que a presença e o aumento de insaturações causaram a diminuição da atividade de Ibead-EBLipC12 (FIGURA 35). Conforme sugerido por Kapoor e Gupta (2012) e Babtie et al. (2010), a preferência de lipases por substratos de cadeia longa está relacionada à presença de resíduos hidrofóbicos no sítio ativo. Assim, ácidos graxos saturados de cadeia longa, por serem mais hidrofóbicos em relação aos de cadeia média e curta, tendem a interagir mais facilmente com o sítio ativo da enzima, que é altamente hidrofóbico

(KAPOOR e GUPTA, 2012; BAPTIE et al., 2010). Porém, no caso de LipC12, o sítio ativo é composto principalmente por resíduos hidrofóbicos, mas resíduos hidrofílicos também compõem esta cavidade (MARTINI, 2012), o que permite que tanto ácidos graxos de cadeia longa como de cadeia média promovam um bom desempenho por parte da enzima, como foi o caso do ácido caprílico utilizado neste estudo (FIGURA 35). A menor atividade de esterificação utilizando-se ácidos graxos insaturados pode estar relacionada à rigidez nas cadeias de ácidos graxos que as duplas ligações promovem e isto faz com que se dobrem, tornando mais difícil a interação com o sítio ativo da enzima (BARROS et al., 1994).

Outros fatores também podem afetar a especificidade da lipase imobilizada, os quais estão relacionados ao suporte utilizado. São eles: efeitos de partição do substrato, que o torna menos acessível ao microambiente da lipase imobilizada, alterações na conformação da lipase, e impedimento estérico, que pode tornar a enzima menos acessível para o substrato (PENCREACH, LEULLIER e BARATTI, 1997).

5.4.9 Efeito do comprimento da cadeia do álcool

Álcoois são utilizados em reações de esterificação e transesterificação para obtenção de vários produtos. Entre os principais estão o biodiesel, aditivos de biodiesel e aromas. Em reações de síntese do biodiesel e aditivos, álcoois de cadeia curta como metanol e etanol são utilizados (KIM et al., 2013; RAITA et al., 2011), álcoois com cadeia maior como propanol e butanol, ou até mesmo aromáticos, como o álcool de cinamilo, podem ser utilizados na síntese de aromas (MARTINS et al., 2011; YADAV e DEVENDRAN, 2012). No entanto, existem poucos estudos que avaliam a seletividade da enzima em relação ao álcool, o que ajudaria a definir a melhor aplicação para determinadas lipases.

Neste trabalho, para avaliar o efeito do comprimento da cadeia do álcool na atividade Ibead-EBLipC12, reações de esterificação foram realizadas em *n*-hexano, com o ácido graxo que havia apresentado maior atividade no estudo anterior (5.4.8), que foi o ácido palmítico e álcoois de diferentes comprimentos de cadeia (metanol, etanol, iso-propanol, propanol e butanol).

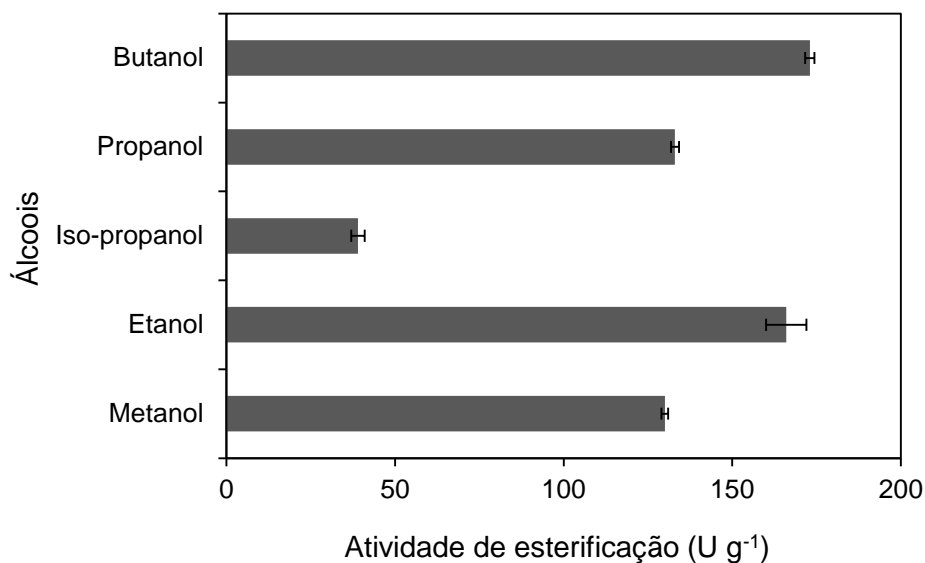


FIGURA 36 - ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO DE IBEAD-EBLIPC12 FRENTE A ALCÓOIS DE DIFERENTES TAMANHOS DE CADEIA

Condições: meio reacional de 5 mL com 70 mmol L⁻¹ de ácido palmítico, 210 mmol L⁻¹ de álcool em *n*-hexano, 80 mg de lipase imobilizada, 40 °C e 250 rpm. Teor de ácidos graxos residuais analisado pelo método de Lowry-Tinsley.

Dentre os álcoois estudados, a menor atividade de esterificação foi encontrada para o iso-propanol (álcool secundário). Todos os demais álcoois apresentaram atividades de esterificação acima de 140 U mg⁻¹. A baixa atividade encontrada para o iso-propanol provavelmente se deve a efeitos estéricos, tendo em vista que a hidroxila está ligada ao carbono secundário, diferentemente dos outros álcoois em que a hidroxila é ligada ao carbono primário (FIGURA 36). O fato de as atividades encontradas serem altas mesmo para álcoois de cadeia curta, como o metanol e o etanol pode ser explicado pela baixa concentração destes e pela presença majoritária de *n*-hexano no meio reacional, que teria um efeito de proteção à enzima (TAN, LU e NIE, 2010).

Segundo Abbas e Comeau (2003), o comportamento da enzima, após interagir com o álcool, depende da energia de ligação entre eles, que é liberada quando o substrato se liga ao sítio ativo da lipase. Gandhi et al. (1995) relatam que quanto maior a cadeia de álcool, maior é a energia liberada o que pode levar à maior atividade da enzima. Isto porque parte desta energia liberada serve para alterar a conformação do

substrato de modo a ajustá-lo no sítio ativo da enzima, e a outra parte provocará mudanças na estrutura da enzima para torna-la um catalisador mais eficiente.

No entanto, muitos trabalhos de síntese de ésteres comprovam que mesmo álcoois de cadeia curta como o etanol e metanol têm comprimento suficiente para uma catálise eficiente tanto na presença como na ausência de solvente (MADALOZZO et al., 2014; BARON et al., 2014; SOARES et al., 2013).

5.5 REAÇÕES DE SÍNTESE EM SISTEMAS LIVRE DE SOLVENTE

A remoção do solvente do meio reacional pode, potencialmente, reduzir os custos de processos catalisados por enzimas, pois facilita a purificação do produto e evita a necessidade de recuperar e reciclar o solvente. Além disso, a produtividade do processo é aumentada. As reações em que Ibead-EBLipC12 poderia apresentar melhor desempenho em sistemas livres de solvente foram selecionadas com base nos resultados das etapas anteriores e com base no tipo de aplicação da enzima. Ibead-EBLipC12 foi utilizada na síntese de ésteres para três diferentes aplicações: na síntese do oleato de etila, um sistema modelo para ésteres do biodiesel, na síntese de um éster de aroma (caprilato de etila) e na síntese de um lipídio estruturado.

5.5.1 Síntese do oleato de etila

Devido ao bom desempenho mostrado por Ibead-EBLipC12 na síntese do oleato de etila em *n*-hexano (99% em 60 min), a lipase foi utilizada para catalisar a mesma reação, mas em sistema livre de solvente.

Inicialmente foram feitos experimentos com razão molar etanol:ácido oleico de 3:1, e a adição do etanol ocorreu em uma única etapa no início da reação. Entretanto, não houve conversão em éster, mesmo após 72 h de reação (dados não mostrados). Devido a estes resultados, a razão molar foi reduzida para 1:1, com o etanol adicionado em uma única etapa no início da reação. Os resultados (FIGURA 37)

indicaram que a redução da razão molar para 1:1 não foi suficiente para proporcionar um aumento significativo da conversão, que foi de apenas 30%.

Em outro experimento, foi adotada a estratégia da adição do etanol em etapas, que tem sido proposta e utilizada por vários autores para diminuir o efeito deletério do álcool sobre a atividade de lipases (MENG et al., 2011; LI, CHEN e TAN, 2011). Os dados da Figura 37 mostram que quando o etanol foi adicionado em 6 etapas com 1,77 mmol cada, o que é equivalente a uma razão molar 1:1 (etanol:ácido oleico), atingiu-se uma conversão de 85% em 48 h. Com o intuito de aumentar a conversão, as alíquotas de etanol continuaram a ser adicionadas até 72 h (correspondentes a uma razão molar etanol:ácido oleico de 2:1), mas após esse período a conversão aumentou em apenas 3%.

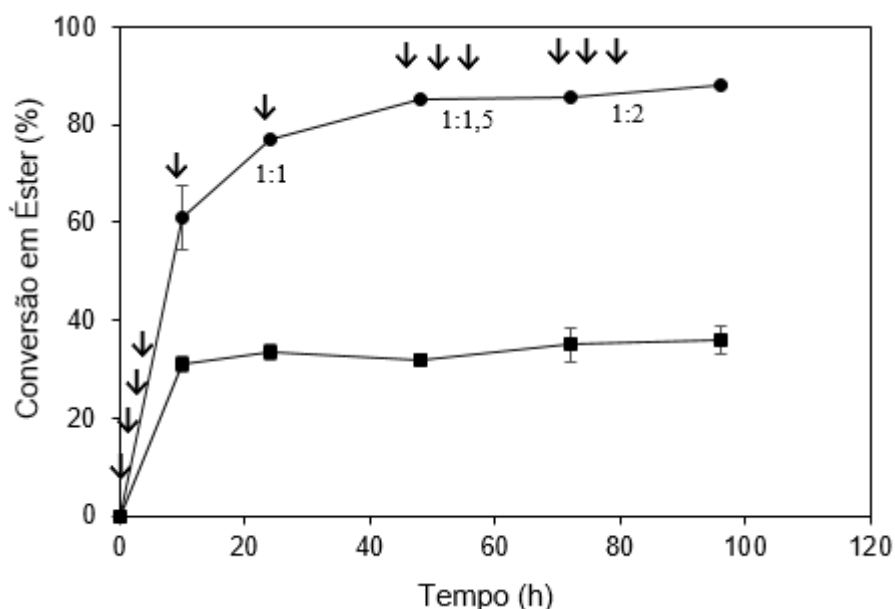


FIGURA 37 – SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE CATALISADA POR IBEAD-EBLIPC12

Legenda: (■) adição do etanol em 1 etapa e (●) adição do etanol em 12 etapas.

Condições: 10,6 mmol de ácido oleico, 10,6 mmol ou 21,2 mmol de etanol (razão molar etanol:ácido oleico de 1:1 ou 2:1), 600 mg de Ibead-EBLipC12; 40 °C e 300 rpm. Teor de éster analisado por CG.

As vantagens da adição do álcool em etapas também foram relatadas por Sun et al. (2010), que utilizaram a lipase de *R. oryzae* (IFO 4697) como catalisador de uma metanólise para a produção de biodiesel em meio livre de solvente com a adição de metanol em 3 etapas, e observaram um alto rendimento em éster (94%) e maior estabilidade da lipase, que pôde ser reutilizada por 10 vezes. Madalozzo et al. (2014)

também demonstraram que, com a adição de etanol em 12 etapas, o rendimento da reação de síntese do oleato de etila em *n*-hexano aumentou de 18 para 76%, utilizando a lipase recombinante de *Rhizopus oryzae* imobilizada em Accurel.

A utilização de sistemas livres de solvente é altamente desejável para a síntese de biodiesel em escala industrial, visto que não só maximiza a produtividade volumétrica do reator, mas também evita a necessidade de recuperar e reciclar o solvente (FORESTI e FERREIRA, 2005; QIN et al., 2008). Neste contexto, apesar do bom desempenho de Ibead-EBLipC12 na síntese do oleato de etila em sistema livre de solvente, com 85% de conversão em éster em 48 h, o processo ainda precisa ser otimizado, pois conversões mais altas podem ser atingidas em tempos menores de reação, como relatado por alguns autores. Por exemplo, Li, Chen e Tan (2011) obtiveram uma conversão de 80% em 3 h na síntese do oleato de etila utilizando a lipase de *Candida* sp imobilizada em uma membrana de tecido (algodão e seda) (7% em relação a massa de ácido oleico), e Trubiano, Borio e Errazu (2007) relataram uma conversão de 80% em 60 min na mesma reação utilizando a lipase de *C. antarctica* B (Novozyme 435) (10% em relação à massa de ácido oleico).

5.5.2 Síntese do caprilato de etila – éster de aroma

Segundo Sun et al. (2012), ésteres produzidos a partir do ácido caprílico produzem aromas de damasco (caprilato de etila), gim (caprilato de propila), floral (caprilato de isobutila), manteiga e ervas (caprilato de butila), abacaxi (caprilato de isoamila).

Considerando o bom desempenho de Ibead-EBLipC12 na reação de síntese do caprilato de etila em *n*-hexano (FIGURA 35), esta reação foi escolhida para realizar a síntese deste éster em sistema livre de solvente. A razão molar de 1:1, assim como na reação de síntese do oleato de etila, também foi utilizada para minimizar o efeito negativo do etanol sobre a atividade da enzima. Primeiramente, houve a adição direta do etanol no início da reação, mas nesta condição, a conversão em éster foi mínima (6%) mesmo após 96 h de reação (FIGURA 38). Novamente, a estratégia de adição do etanol em etapas foi utilizada nas mesmas condições de ensaio. Alíquotas de 2,3 mmol de etanol foram adicionadas em 6 etapas até 24 h, mas mesmo após 96 h, a conversão foi de apenas 7% (FIGURA 38).

Nesta reação de síntese do caprilato de etila, o efeito negativo do etanol sobre a lipase não foi amenizado pela metodologia de adição do etanol em etapas. Uma das explicações para este fato é que o ácido caprílico, sendo menos apolar, reduz a hidrofobicidade do meio que ficaria mais homogêneo, fazendo com que o etanol tenha acesso à lipase com mais facilidade, promovendo a inibição competitiva ou a desnaturação da enzima (JIN et al., 2012). Ao contrário do que ocorre quando se utiliza um ácido graxo de cadeia mais longa, como o ácido oleico utilizado na síntese do oleato de etila. Um ácido graxo de cadeia longa, ou seja, mais apolar pode ter um efeito protetor da lipase, por tornar o meio mais hidrofóbico e com menos possibilidade de remoção da água essencial em torno da enzima.

Sun et al. (2012) utilizaram o óleo de coco e álcoois de diferentes tamanhos de cadeia para promover uma reação de transesterificação e obter ésteres do ácido caprílico para utilização como aromas, visto que o ácido caprílico é um dos ácidos graxos de cadeia média de maior quantidade no óleo de coco (8,4%). A reação ocorreu na ausência de solvente utilizando a lipase Lipozyme TL IM e após a otimização das condições da reação (razão molar álcool:óleo 3:1, 15% da massa de enzima em relação à massa de substratos, 23 °C, 130 rpm e tempo de reação 20 h), os autores relataram a obtenção de ésteres do ácido caprílico a partir dos diferentes álcoois utilizados, sendo que os ésteres que ocorreram em maior quantidade foram caprilato de iso-amila (22,6%), caprilato de iso-butila (8,9%), e caprilato de etila (5,8%). Portanto, assim como no presente trabalho, Sun et al. (2012) também encontraram um baixo rendimento em éster de aroma quando o etanol foi utilizado. Os resultados de Sun et al. (2012) sugerem que maiores rendimentos em ésteres do ácido caprílico seriam obtidos com o aumento da cadeia do álcool (como o propanol e o butanol), que tornaria o meio mais hidrofóbico, seguindo o que foi proposto acima (JIN et al., 2012).

Alguns autores que descrevem a síntese de ésteres de aromas ainda utilizam solventes no meio reacional. Este é o caso de Martins et al. (2011) que estudaram a síntese do acetato de butila (aroma de maçã) em *n*-hexano. Os autores obtiveram 90% de conversão em apenas 2,5 h, após a otimização da reação variando-se parâmetros como quantidade de enzima no meio reacional, razão molar álcool:ácido graxo, temperatura e tempo de reação. Este resultado mostra que o solvente protege a enzima contra os efeitos deletérios dos substratos e que em alguns casos a remoção do solvente nem sempre é vantajosa.

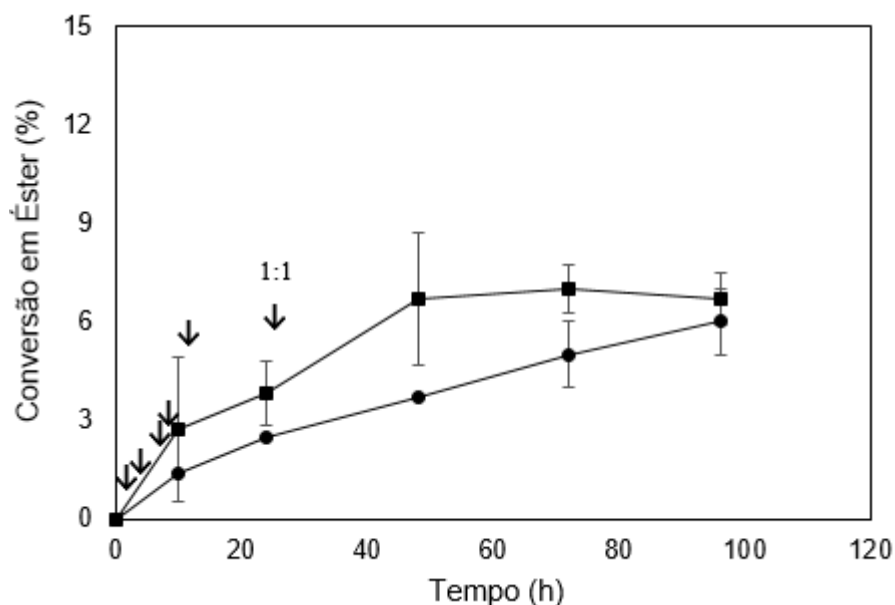


FIGURA 38 – SÍNTESE DO CAPRILATO DE ETILA EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE CATALISADA POR IBEAD-EBLIPC12

Legenda: (●) adição do etanol em 1 etapa e (■) adição do etanol em 6 etapas.

Condições: Razão molar 1:1 (ácido caprílico:etanol) 13,87 mmol de ácido caprílico, 13,87 mmol de etanol, 400 mg de Ibead-EBLipC12; 40 °C e 300 rpm. Teor de éster analisado por CG.

5.5.3 Síntese de um lipídio estruturado

O principal objetivo de produzir um lipídio com ácidos graxos de cadeia média nas posições *sn*-1 e *sn*-3 e um ácido graxo de cadeia longa na posição *sn*-2 (MLM) é obter um produto de baixa caloria (5-7 kcal g⁻¹) necessário principalmente para tratamento da obesidade e na dieta de pessoas com má absorção intestinal (XU, 2000; SMITH et al., 1994). O valor dietético deste lipídio está relacionado ao fato de que a lipase pancreática humana *sn*-1,3 específica libera os ácidos graxos de cadeia média que são absorvidos e subsequentemente metabolizados pelo fígado para serem utilizados como energia, não sendo armazenados no tecido adiposo (OSBORN e AKOH, 2002). Os monoacilgliceróis resultantes da hidrólise pela lipase pancreática, compostos por um ácido graxo de cadeia longa insaturado, são ligeiramente solúveis em água, o que facilita sua absorção pelos enterócitos, no intestino delgado (MU e PORSGAARD, 2005).

Para a síntese enzimática de lipídeos do tipo MLM, devem ser utilizadas lipases *sn*-1,3 específicas, como é o caso de LipC12, o que justificou os estudos de

transesterificação ácida (acidólise) entre o azeite de oliva e ácido caprílico utilizando Ibead-EBLipC12.

Segundo Reda e Carneiro (2007), o azeite de oliva apresenta em sua composição somente ácidos graxos de cadeia longa ($> C_{12:0}$), com teor de até 83% de ácido oleico. A composição em ácidos graxos do azeite de oliva utilizado neste trabalho e a percentagem de inserção do ácido caprílico na cadeia dos triacilgliceróis foi determinada por análise em CG e estão apresentadas na Tabela 16. Observou-se que, após a reação de acidólise por 72 h, houve a inserção de 23% de ácido caprílico no azeite de oliva (TABELA 16; APÊNDICE A).

TABELA 16 – COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GRAXOS DO AZEITE DE OLIVA ANTES E DEPOIS DA REAÇÃO DE ACIDÓLISE CATALISADA POR IBEAD-EBLIPC12

Composição do azeite de oliva		
Ácidos Graxos	Antes da reação	Depois da reação
Ácido Caprílico (%)	-	$23 \pm 1,2$
Ácido Palmítico (%)	$13 \pm 0,7$	$9 \pm 0,1$
Ácido Oleico (%)	$80 \pm 1,3$	$63 \pm 1,4$
Ácido Linoleico (%)	$7 \pm 0,3$	5

Condições: Razão molar 1:2 (azeite de oliva:ácido caprílico) 3 g de azeite de oliva e 0,98 g de ácido caprílico, 600 mg de Ibead-EBLipC12; 40 °C e 300 rpm. Composição de ácidos graxos no triacilglicerol analisada por CG.

Este resultado é muito promissor quando comparado com outros trabalhos que avaliaram esta mesma reação, visto que no presente trabalho as condições de reação ainda não foram otimizadas. Nunes et al. (2012), após otimizar as melhores condições da reação em sistema livre de solvente (temperatura e razão molar) por delineamento fatorial, obtiveram a inserção de 14,4% de ácido caprílico no azeite de oliva em 24 h, catalisada pela lipase recombinante de *Rhizopus oryzae* imobilizada em Eupergit C. Rasesa (2012) verificou a incorporação de 6% de ácido caprílico no azeite de oliva, em 24 h, catalisada pelo sólido fermentado de *R. oryzae*.

A análise posicional dos ácidos graxos do lipídio modificado também é importante, visto que o objetivo principal é fazer a inserção do ácido graxo de cadeia média nas posições *sn*-1 e *sn*-3 do triacilglicerol. Para tanto, o produto da reação de

acidólise foi recuperado, o triacilglicerol foi separado dos demais componentes da reação (4.6.7.2) e submetido à hidrólise pela lipase *sn*-1,3 específica de *Rhizopus oryzae* imobilizada (NUNES et al., 2011). O produto da reação de hidrólise foi analisado por cromatografia de camada delgada e a banda correspondente aos monoacilgliceróis (FIGURA 39) foi raspada, derivatizada e analisada por CG (4.6.7.2 e 4.6.7.3). Não foi observada a presença de ácido caprílico nos monoacilgliceróis resultantes da reação de hidrólise, indicando que a inserção do ácido caprílico ocorreu nas posições *sn*-1 e *sn*-3 do triacilglicerol (APÊNDICE B). O ácido graxo presente em maior quantidade nos monoacilgliceróis resultantes da hidrólise foi o ácido oleico, com 18 carbonos e uma insaturação no carbono 9 (18:1 *n*-9). Conforme descrito anteriormente, a absorção intestinal de um monoacilglicerol de cadeia longa ocorre mais facilmente do que um ácido graxo de cadeia longa na forma livre, devido a sua maior solubilidade. Além disso, o ácido oleico presente nos monoacilgliceróis pode proporcionar benefícios à saúde, como, por exemplo, a redução do colesterol LDL (*Low Density Lipoproteins*) e aumento do HDL (*High Density Lipoproteins*) plasma sanguíneo (OSBORN E AKOH, 2002).

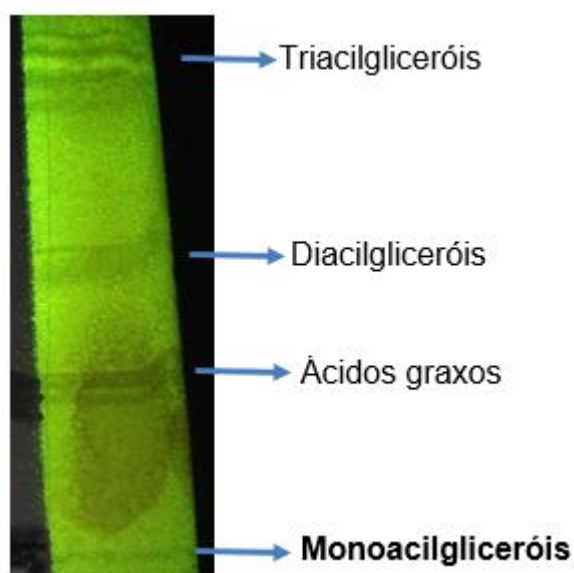


FIGURA 39 - PLACA DE CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA IDENTIFICANDO AS BANDAS CORRESPONDENTES AO PRODUTO DA HIDRÓLISE DO LIPÍDIO ESTRUTURADO

Condições: 150 μ L dos produtos da hidrólise do lipídio estruturado aplicados sobre placas de sílica preparativa (20 \times 10 cm, Sílica gel F254, 0,25 mm de espessura, Merck, Darmstadt, Germany). Eluição: fase móvel composta de *n*-hexano/éter etílico/ácido acético (70:30:1,5, v/v/v). Placas visualizadas em câmara UV a 366 nm. Revelador 2,7-diclorofluoresceína.

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho, estudou-se a imobilização da lipase LipC12, isolada pela técnica de metagenômica, e sua aplicação na síntese de ésteres de interesse industrial. A partir dos resultados obtidos, é possível concluir-se que o melhor suporte para imobilização de LipC12 foi a resina acrílica Immobead 150, que promove a imobilização da enzima por ligações covalentes. Também foi verificado que não há necessidade de purificar LipC12 antes da imobilização, pois a utilização do extrato bruto livre de células como material de partida da imobilização promoveu a imobilização seletiva de LipC12.

LipC12 imobilizada no Immobead 150 a partir do extrato bruto livre de células (Ibead-EBLipC12) apresentou estabilidade ao armazenamento, estabilidade em solventes hidrofílicos e hidrofóbicos, com exceção dos álcoois iso-propanol, etanol e metanol. A enzima imobilizada também apresentou estabilidade em temperaturas de até 60 °C, quando incubada por 24 h.

Ibead-EBLipC12 foi caracterizada como sendo regiosseletiva e tiposseletiva, tendo apresentado as maiores atividades de esterificação, em presença de *n*-hexano, para ácidos graxos saturados de cadeia média e longa (C12:0, C16:0 e C18:0). Quando a reação de esterificação foi testada variando-se o substrato álcool, Ibead-EBLipC12 apresentou maior atividade contra álcoois primários.

Ibead-EBLipC12 catalisou com sucesso as reações de síntese do oleato de etila, um sistema-modelo para a síntese do biodiesel, em meio reacional livre de solvente hexógeno. A adição do etanol em etapas foi necessária para minimizar os efeitos negativos deste solvente sobre a atividade da enzima, o que promoveu conversão em éster de 85% em 48 h. Também em meio livre de solvente, Ibead-EBLipC12 catalisou a síntese de um lipídio nutracêutico do tipo MLM, promovendo a inserção de 23% de ácido caprílico nas posições *sn*-1 e *sn*-3 dos triacilglicerois do azeite de oliva.

Estes resultados são promissores e mostram que a imobilização de lipases, associada à técnica de metagenômica, podem ser utilizadas com sucesso para obtenção de novas lipases com aplicação em Biocatálise.

7 PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos neste trabalho abrem perspectivas de utilização de LipC12 imobilizada em processos biocatalíticos. Portanto, sugerem-se como estudos futuros:

- Utilização de um suporte com características semelhantes às do Immobead (elevada área superficial, poroso e resistente), mas que seja de natureza hidrofóbica, com o intuito de aumentar a estabilidade de LipC12 em reações em sistemas livres de solvente com álcoois de cadeia curta;
- Otimização das reações de síntese de ésteres de biodiesel e de aromas em sistemas livres de solvente com intuito de, reduzir o tempo de reação e possibilitar a reutilização da lipase imobilizada em vários ciclos de reação;
- Utilização de LipC12 imobilizada na síntese de lipídios estruturados para diferentes finalidades, tanto reações de transesterificação ácida como de interesterificação;
- Realização de estudos das reações de síntese em biorreatores de leito fixo, em sistema de batelada e de fluxo contínuo;
- Realização de estudos de viabilidade econômica dos processos biocatalisados por LipC12 imobilizada.

8 REFERÊNCIAS

ABBAS, H.; COMEAU, L. Aroma synthesis by immobilized lipase from *Mucor* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 589-595, 2003.

ABREU, L.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R.C.; VOLPATO, G.; AYUB, M.A.Z. Efficient purification-immobilization of an organic solvent-tolerant lipase from *Staphylococcus warneri* EX17 on porous styrene-divinylbenzene beads. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 99, p. 51-55, 2014.

ADLERCREUTZ, P. **Biocatalysis in non-conventional media**. In: Applied Biocatalysis. Netherlands: Ed. Harwood academic publishers, 2000.

AKOH, C.C.; MOUSSATA C.O. Lipase-catalysed modification of borage oil: incorporation of capric and eicosapentanoic acids to form a structured lipid. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 75, p. 697-701, 1998.

AL-DURI, B.; YONG, Y. P. Lipase immobilisation: an equilibrium study of lipases immobilised on hydrophobic and hydrophilic/hydrophobic supports. **Biochemical Engineering Journal**, v. 4, p. 207-215, 2000.

ALI, Y.; CHAHINIAN, H.; PETRY, S.; MULLER, G.; CARRIÉRE, F.; VERGER, R.; ABDELKARIM, A. Might the Kinetic Behavior of Hormone-Sensitive Lipase Reflect the of the Lid Domain? **Biochemistry**, v. 43, p. 9298-9306, 2004.

ALMEIDA, R. V.; BRANCO, R. V.; PEIXOTO, B.; LIMA, C. S.; ALQUERES, S. M. C.; MARTINS, O. B.; ANTUNES, O. A. C.; FREIRE, D. M. G. Immobilization of a recombinant thermostable esterase (*Pf2001*) from *Pyrococcus furiosus* on microporous polypropylene: Isotherms, hyperactivation and purification. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, p. 531-537, 2008.

ALNOCH, R.B. Imobilização e caracterização de uma nova lipase obtida por prospecção metagenômica. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Departamento de Bioquímica da UFPR, Curitiba, PR, 2013.

ALNOCH, R.C.; MARTINI, V.P.; GLOGAUER, A.; COSTA, A.C.S.; PIOVAN, L.; MULLER-SANTOS, M.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. Immobilization and Characterization of a New Regioselective and Enantioselective Lipase Obtained from a Metagenomic Library. **PLOS one**, v. 10, p. 1-18, 2015.

AL-ZUHAIR, S.; LIG, F. W.; JUN, L. S. Proposed kinetic mechanism of the production of biodiesel from palm oil using lipase. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 951-960, 2007.

AMERICAN OIL CHEMIST'S SOCIETY (AOCS). Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society (Ce 2-66), 4 ed, Champaign, 1997.

ARPIGNY, J. L.; JAEGER, K. E. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. **Biochemical Journal**, v. 343 Pt 1, p. 177-183, 1999.

BABTIE, A.; TOKURIKI, N.; HOLLFELDER, F. What makes an enzyme promiscuous? **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 14, p. 200-207, 2010.

BANDMANN, N.; COLLET, E.; LEIJEN, J.; UHLÉN, M.; VEIDE, A.; NYGREN, P.A. Genetic engineering of the *Fusarium solani* pisi lipase cutinase for enhanced partitioning in PEG-phosphate aqueous two-phase systems. **Journal of Biotechnology**, v. 79, p. 161-172, 2000.

BARON, A. M. Preparação e caracterização de lipases imobilizadas para utilização em biocatálise. Tese de Doutorado, 81 p. Programa de Pós-Graduação em Química, Departamento de Química da UFPR, Curitiba, PR, 2008.

BARON, A.M.; ZAGO, E.C.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. SPIL: Simultaneous production and immobilization of lipase from *Burkholderia cepacia* LTEB11. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 29, p.19-24, 2011.

BARON, A.M.; BAROUH, N.; BAREA, B.; VILLENEUVE, P.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. Transesterification of castor oil in a solvent-free medium using the lipase from *Burkholderia cepacia* LTEB11 immobilized on a hydrophobic support. **Fuel**, v. 117, p. 458-462, 2014.

BARROS, R.J.; MOURA-PINTO, P.G.V.; FRANSSEN, M.C.R.; ANJA E. M. JAMSENT, A.E.M.; GROAT, A. Regioselectivity and Fatty Acid Specificity of *Chromobacterium viscosum* Lipase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 2, p. 707-713, 1994.

BASRI, M.; AMPON, K.; WAN YUNUS, W.M.Z.; RAZAK, C.N.A.; SALLEH, A.B. Immobilization of hydrophobic lipase derivation on to organic polymer beads. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 59, p. 37, 1994.

BASTIDA, A.; SABUQUILLO, P.; ARMISÉN, P.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, P.; HUGUET, J.; GUISÁN, J.M. A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 58, p. 486-493, 1998.

BAYRAMOGLU, G.; HAZER, G.; ALTINTAS, B.; ARICA, M, Y. Covalent immobilization of lipase onto amine functionalized polypropylene membrane and its application in green apple flavor (ethyl valerate) synthesis. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 372-378, 2011.

BERGER, R.G. Biotechnology of flavours - the next generation. **Biotechnology Letters**, v. 31, p. 1651-9, 2009.

BIVER, S.; VANDENBOL, M. Characterization of three new carboxylic ester hydrolases isolated by functional screening of a forest soil metagenomic library. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 40, p. 191-200, 2013.

BOKADE, V.V.; YADAV, G.D. Transesterification of edible and nonedible vegetable oils with alcohols over heteropolyacids supported on acid-treated clay. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48, p. 9408-15, 2009.

BON, E.P.S.; FREIRE, D.M.G.; MENDES, M.F.; SOARES, V.F. Immobilization of *Aspergillus niger* beta-D-glucosidase on Aminates Chitin and Aluminate. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, v. 11, p. 291-299, 1986.

BORNSCHEUER, T.U.; BESSLER, C.; SRINIVAS, R.; KRISHNA, H.S. Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. **Trends in Biotechnology**, v. 20, p. 433-437, 2002.

BOSE, A.; KEHARIA, H. Production, characterization and applications of organic solvent tolerant lipase by *Pseudomonas aeruginosa* AAU2. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, p. 255-266, 2013.

BRADY, L.; BRZOZOWSKI, A.M.; DEREWENDA, Z.S.; DODSON, E.; DODSON, G.; TOLLEY, S.; TURKENBURG, J.P.; CHRISTIANSEN, L.; HUGE-JENSEN, B.; NORSKOV, L.; MENGE, U. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. **Nature**, v. 343, p. 767-770, 1990.

BRASIL. Resolução ANP nº 7, de 19 de março de 2008. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2008.

BRAULT, G.; SHARECK, F.; HURTUBISE, Y.; LÉPINE, F.; DOUCET, N. Short-Chain Flavor Ester Synthesis in Organic Media by an *E. coli* Whole-Cell Biocatalyst Expressing a Newly Characterized Heterologous Lipase. **Plos One**, v. 9, p. 1-9, 2014.

BRAUN, B.; KLEIN, E. Immobilization of *Candida rugosa* lipase to nylon fibers using its carbohydrate groups as the chemical link. **Biotechnology and Bioengineering**, v.51, p. 327-341, 1996.

BUNTERNGSOOK, B.; KANOKRATANA, P.; THONGARAM, T.; TANAPONGPIPAT, S.; UENGWETWANIT, T.; RACHDAWONG, S.; VICHITSOONHONKUL, T.; EURWILAICHITR, L. Identification and characterization of lipolytic enzymes from a peat-swamp forest soil metagenome. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 74, p. 1848-1854, 2010.

CAO, L.; BORNSCHEUER, U.T.; SCHMID, R.D. Lipase-catalyzed solid-phase synthesis of sugar esters. Influence of immobilization on productivity and stability of the enzyme. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 6, p. 279-285, 1999.

CARTA, G.; GAINER, J. L.; BENTON, A. H. Enzymatic synthesis of esters using an immobilized lipase. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 37, p. 1004-1009, 1991.

CARRÍN, M.E; CRAPISTE, G.H. Enzymatic acidolysis of sunflower oil with a palmitic–stearic acid mixture. **Journal of Food Engineering**, v. 84, p. 243-249, 2008.

CHIOU, S. H.; WU, W. T.; Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl group. **Biomaterials**, v. 25, p. 197-204, 2004.

CHOW, J.; KOVACIC, F.; ANTONIA, Y.D.; KRAUSS, U.; FERSINI, F.; SCHMEISSER, C.; LAUINGER, B.; BONGEN, P.; PIETRUSZKA, J.; SCHMIDT, M.; MENYES, I.; BORNSCHEUER, U.T.; ECKSTEIN, M.; THUM, O.; LIESE, A.; MUELLER-DIECKMANN, J.; JAEGER, K.; STREIT, W.R. The Metagenome-Derived Enzymes LipS and LipT Increase the Diversity of Known Lipases. **Plos one**, v. 7, 2012.

CHUN, G.T.; AGATHOE, S.N. Immobilization of Tolypocladium inflatum spores into porous Celite beads for cyclosporin production. **Journal of Biotechnology**, v. 9, p. 237-254, 1989.

COLOMBIE, S; GAUNAND, A; LINDET, B. Lysoenzyme inactivation and aggregation in stirred-reactor. **Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 11, p. 559-65, 2001.

COLTON, I. J.; AHMED, S. N.; KAZLAUSKAS, R. J. A 2-propanol treatment increases the enantioselectivity of Candida rugosa lipase toward esters of chiral carboxylic-acids. **Journal of Organic Chemistry**, v. 60, p. 212-217, 1995.

CÔTÉ, A.; SHARECK, F. Expression and characterization of a novel heterologous moderately thermostable lipase derived from metagenomics in *Streptomyces lividans*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, p. 883-891, 2010.

COTTRELL, M.T.; MOORE, J.A.; KIRCHMAN, D.L. Chitinases from uncultured marine microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 2553-2557, 1999.

COUTO, G.H.; GLOGAUER, A.; FAORO, H.; CHUBATSU, L.S.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O. Isolation of a novel lipase from a metagenomic library derived from mangrove sediment from the south Brazilian coast. **Genetics and Molecular Research**, v.9, p. 514-523, 2010.

COURTOIS, S.; CAPPELLANO, C.M.; BALL, M.; FRANCOU, F.X.; NORMAND, P.; HELYNK, G.; MARTINEZ, A.; KOLVEK, S.J.; OSBURNE, M.S.; AUGUST, P.R.; NALIN, R.; GUERINEAU, M.; JEANNIN, P.; SIMONET, P.; PERNODET, J.L. Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 49-55, 2003.

CYGLER M.; SCHRAG, J.D. Structure as basis for understanding interfacial properties of lipases. **Methods in Enzymology**, v. 284, p. 3-27, 1997.

DALHUS, B.; SAARINEN, M.; SAUER, U.H.; PÄR EKLUND, P.; JOHANSSON, K.; KARLSSON, A.; RAMASWAMY, S.; BJORK, A.; SYNSTAD, B.; NATERSTAD, K.; SIREVAG, R.; EKLUND, H. Structural Basis for Thermophilic Protein Stability: Structures of Thermophilic and Mesophilic Malate Dehydrogenases. **Journal of Molecular Biology**, v. 318, p. 707-721, 2002.

DANIEL, R.M.; DUNN, R.V.; FINNEY, J.C.; SIMITH, J.C. The role of dynamics in enzyme activity. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 32, p. 69-92, 2003.

DHAKE, K.P.; BHATTE, K.D.; WAGH, Y.S.; SINGHAL, R.S.; BHANAGE, B.M. Immobilization of Steapsin Lipase on Macroporous Immobead-350 for Biodiesel Production in Solvent Free System. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 17, p. 959-965, 2012.

DHARMSTHITI, S.; LUCHAI, S. Production, purification and characterization of thermophilic lipase from *Bacillus* sp. THL027. **FEMS Microbiology Letters**, v. 179, p. 241-246, 1999.

DHEEMAN, D.S.; HENEHAN, G.T.M.; FRIAS, J.M. Purification and properties of *Amycolatopsis mediterranei* DSM 43304 lipase and its potential in flavour ester synthesis. **Bioresource Technology**, v.102, p. 3373-3379, 2011.

DIECKMANN, J.; JAEGER, K.E.; STREIT, W.R. The Metagenome-Derived Enzymes LipS and LipT Increase the Diversity of Known Lipases. **Plos One**, v.7, p. 1-16, 2012.

DOUKYU, N.; OGINO, H. Organic solvent-tolerant enzymes. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, p. 270-282, 2010.

ENGASSER, J. M.; HORVATH, C. Diffusion and kinetics with immobilized enzymes. **Applied Biochemistry and Bioengineering**, v. 4 p. 128-216, 1976.

FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**, 4 ed. Springer: Berlin, 2000.

FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**. A Textbook, 5th ed. Springer, New York, 454p, 2004.

FAN, X.; LIU, X.; WANG, K.; WANG, S.; HUANG, R.; LIU, Y. Highly soluble expression and molecular characterization of an organic solvent-stable and thermotolerant lipase originating from the metagenome. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 72, p. 319-326, 2011.

FERNANDES, M. L. M.; SAAD, E. B.; MEIRA, J. A.; RAMOS, L. P.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 44, p. 8-13, 2007.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; ARMISÉN, P.; SABUQUILLO, P.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; GUISÁN, J.M. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 93, p. 185-197, 1998.

FORESTI, M. L.; FERREIRA, M. L. Solvent-free ethyl oleate synthesis mediated by lipase from *Candida Antarctica* B adsorbed on polypropylene powder. **Catalysis Today**, v. 107-108, p. 23-30, 2005.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils: review. **Journal of the Bioscience and Bioengineering**, v. 92, p.405-416, 2001.

GANDHI, N.N.; SAWANT, S.B.; JOSHI, J.B. Specificity of a Lipase in Ester Synthesis: Effect of Alcohol. **Biotechnology Progress**, v.11, 282-287, 1995.

GHAMGUI, H.; MILED, N.; KARRA-CHAÂBOUNI, M.; GARGOURI, Y. Immobilization studies and biochemical properties of free and immobilized *Rhizopus oryzae* lipase onto CaCO₃: A comparative study. **Biochemical Engineering Journal**, v.37, p. 34-41, 2007.

GHANEM, A. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. **Tetrahedron**, v. 63, p. 1721-1754, 2007.

GILLIES, B.; YAMAZAKI, H.; ARMSTRONG, D.W. Production of flavor esters by immobilized lipase. **Biotechnology Letters**, v. 9, p. 709-14, 1987.

GLOGAUER, A.; MARTINI, V.P.; FAORO, H.; COUTO, G.H.; SANTOS, M.M.; MONTEIRO, R.A.; MITCHELL, D.A.; SOUZA, E.S.; PEDROSA, F.O.; KRIEGER, N. Identification and characterization of a new true lipase isolated through metagenomic approach. **Microbial Cell Factories**, v. 10, 2011.

GOLI, S. A. H.; SAHRI, M. M.; KADIVAR, M. Enzymatic interesterification of structured lipids containing conjugated linoleic acid with palm stearin for possible margarine production. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 110, p. 1102-1108, 2008.

GONÇALVES, A. P. V. Imobilização de uma cutinase recombinante no zeólito NaY: estudos cinéticos e da estabilidade. Dissertação de mestrado, 58 p. Insituto Superior Técnico Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa, Portugal, 1999.

GROCHULSKI, P.; LI, Y. G.; SCHRAG, J. D.; BOUTHILLIER, F.; SMITH, P.; HARRISON, D.; RUBIN, B.; CYGLER, M. Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 12843-12847, 1993.

GUILLÉN, M.; BENAIGES, M. D.; VALERO, F. Biosynthesis of ethyl butyrate by immobilized recombinant *Rhizopus oryzae* lipase expressed in *Pichia pastoris*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 65, p. 1-9, 2012.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p.763-781, 2004.

GUPTA, R.; RATHI, P.; BRADDOO, S. Lipase mediated upgradation of dietary fats and oils. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 43, p. 635-644, 2003.

GUPTA, N.; RATHI, P.; SINGH, R.; GOSWANI, V. K.; GUPTA, R. Single-step purification of lipase from *Burkholderia multivorans* using polypropylene matrix. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, p. 648-653, 2005.

GUPTA, M.N.; ROY, I. Enzymes in organic media - Forms, functions and applications. **European Journal of Biochemistry**, v. 271, p. 2575-2583, 2004.

HALLING, P.J. High affinity bindings of water by proteins is similar in air and in organic solvents. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1040, p. 225, 1990.

HAMA, S.; YAMAJI, H.; FUKUMIZU, T.; NUMATA, T.; TAMALAMPUDI, S.; KONDO, A.; NODA, H.; FUKUDA, H. Biodiesel-fuel production in a packed-bed reactor using lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, p. 273-278, 2007.

HANDELSMAN, J.; RONDON, S. F.; BRADY, J.; CLARDY, R. M. Molecular biology provides access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry & Biology**, v. 5, p. 245-249, 1998.

HANEFELD, U; GARDOSI, L.; MAGNER, B. Understanding enzyme immobilization. **Chemical Society Reviews**, v. 38, p. 453-468, 2009.

HANG, Q.; WOODS, L.; FEISSI, M.; CATALANO, C. E. Cloning, Expression, and Biochemical Characterization of Hexahistidine-tagged Terminase Proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 15305-15314, 1999.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 235-251, 2006.

HENNE, A.; SCHIMITZ, R.A.; BOMEKE, M.; GOTTSCHALK, G.; DANIEL, R. Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 3113-3116, 2000.

HITA, E.; ROBLES, A.; CAMACHO, B.; GONZÁLEZ, P.A; ESTEBAN, L.; JIMÉNEZ, M.J.; MUÑO, M.M.; MOLINA, E. Production of structured triacylglycerols by acidolysis catalyzed by lipases immobilized in a packed bed reactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 46, p. 257-264, 2009.

HONG, J. H.; PARK, M. C.; HONG, S. K.; KIM, B. S. Preparation of an anion-exchange membrane by the amination of chlorinated polypropylene and polyethyleneimine at a low temperature and its ion-exchange property. **Journal of Applied Polymer Science**, v.112, p. 830-5, 2009.

HORCHANI, H.; OUERTANI, S.; GARGOURI, Y.; SAYARI, A. The N-terminal His-tag and the recombination process affect the biochemical properties of *Staphylococcus aureus* lipase produced in *Escherichia coli*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 61, p.194-201, 2009.

HORCHANI, H.; SABRINA, L.; RÉGINE, L.; SAYARI, A.; GARGOURI, Y.; VERGER, R. Heterologous expression and N-terminal His-tagging processes affect the catalytic properties of staphylococcal lipases: A monolayer study. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 350, p.586-594, 2010.

HU, Y.; FU, C.; HUANG, Y.; YIN, Y.; CHENG, G.; FANG LEI, F.; LU, N.; LI, J.; ELIZABETH JANE ASHFORTH, E.J.; LIXIN ZHANG, L.; ZHU, B. Novel lipolytic genes

from the microbial metagenomic library of the South China Sea marine sediment. **FEMS Microbiology Ecology**, v.72, p. 228-237, 2010.

IVANOV, A. E.; SCHNEIDER, M. P. Methods for the immobilization of lipases and their use for ester synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.3 p. 303-309, 1997.

JAEGER, K.E.; DIJKSTRA, B.W.; REETZ, M.T. Bacterial Biocatalist: molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications os lipases. **Annual Review of Microbiology**., v. 53, p. 315-351, 1999.

JAEGER, K. E.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B.; COLSON, C.; HEUVEL, M.; MISSET, O. Bacterial lipases. **FEMS Microbiology Reviews**., v.15, p. 29-63, 1994.

JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 396-403, 1998.

JENNINGS, B. H.; AKOH, C. C. Lipase catalyzed modification of fish oil to incorporate capric acid. **Food Chemistry**, v. 72, p. 273-278, 2001.

JEON, J. H.; KIM, J. T.; KANG, S. G.; LEE, J. H.; KIM, S. J. Characterization and its Potential Application of Two Esterases Derived from the Arctic Sediment Metagenome. **Marine Biotechnology**, v. 11, n. 3, p. 307-316, 2009.

JIN, Z.; NTWALI, J.; HAN, S.; ZHENG, S.; LIN, Y. Production of flavor esters catalyzed by CALB-displaying *Pichia pastoris* whole-cells in a batch reactor. **Journal of Biotechnology**, v. 159, p.108-114, 2012.

KAEWTHONG, W.; SIRISANSANEEYAKUL, S.; PRASERTSAN, P.; H-KITTIKUN, A. Continuous production of monoacylglycerols by glycerolysis of palm olein with immobilized lipase. **Process Biochemistry**, v. 40, p.1525-1530, 2005.

KAGA, H.; SIEGMUND, B.; NEUFELLNER, E.; FABER, K. Stabilization of Candida lipase against acetaldehyde by adsorption onto Celite. **Biotechnology Therapeutics**. 8, 369-374, 1994.

KAIEDA, M.; SAMUKAWA, T.; KONDO, A.; FUKUDA, H. Effect of methanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalyzed by various lipases in a solvent-free system. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 91, p. 12-15, 2001.

KAMORI, M.; HORI, T.; YAMASHITA, Y.; HIROSE, Y.; NAOSHIMA, Y. Immobilization of lipase on a new inorganic ceramics support, toyonite, and the reactivity and enantioselectivity of the immobilized lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 9, p. 269-274, 2000.

KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 555-569, 2012.

KATCHALSKI-KATZIR, K.; KRAEMER, D.M. Eupergit® C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 10, p. 157–176, 2000.

KAZLAUSKAS, R.; WEISSFLOCH, A.N.E.; RAPPAPORT, A.T.; CUCCIA, L.A. A Rule To Predict Which Enantiomer of a Secondary Alcohol Reacts Faster in Reactions Catalyzed by Cholesterol Esterase, Lipase from *Pseudomonas cepacia*, and Lipase from *Candida rugosa*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 56, p. 2656-2665, 1991.

KHAN, M.; JITHESH, K. Expression and purification of organic solvent stable lipase from soil metagenomic library. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 2417-2424, 2012.

KIM, E.Y.; OH, K.H.; LEE, M.H.; KANG, C.H.; TAE-KWANG OH, T.K.; YOON, J.H. Novel Cold-Adapted Alkaline Lipase from an Intertidal Flat Metagenome and Proposal for a New Family of Bacterial Lipases. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 257-260, 2009.

KIM, J.; W, GRATE, W.J.; WANG, P. Nanostructures for enzyme stabilization. **Chemical Engineering Science**, v.61, p.1017-1026, 2006.

KIM, S.H.; KIM, S.; PARK, S.; KIM, H.K. Biodiesel production using cross-linked *Staphylococcus haemolyticus* lipase immobilized on solid polymeric carriers. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 85-86, p.10-16, 2013.

KLIBANOV, A.M. Why are enzymes less active in organic solvents than in water? **Trends in Biotechnology**, v.15, p. 97-101, 1997.

KNEZEVIC, Z.; MILOSAVIC, N.; BEZBRADICA, D.; JAKOVLJEVIC, Z. PRODANOVIC, R. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Eupergit® C supports by covalent attachment, **Biochemical Engineering Journal**, v.30, p. 269-278, 2006.

KOLLING, D. J.; SEGUINO, W. A.; BROD, F. C. A.; ARISI, A. C. M. Immobilization of a Recombinant Esterase from *Lactobacillus plantarum* on Polypropylene Accurel MP-1000. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.163, p. 304-312, 2011.

KRIEGER, N.; BHATNAGAR, T.; BARATTI, J.C.; BARON, A.M.; LIMA, V.M.G.; MITCHELL, D.A. Non-aqueous biocatalysis in heterogeneous solvent systems. **Food Technology and Biotechnology**, v.42, p. 279-286, 2004.

KRISHNA, S.H.; DIVAKAR, S.; PRAPULLA, S.G.; KARANTH, N.G. Enzymatic synthesis of isoamyl acetate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*. **Journal of Biotechnology**, v. 87, p.193-201, 2001.

KRISHNA, S. H.; KARANTH, N. G. Lipases and lipase-catalyzed esterification reactions in nonaqueous media. **Catalysis Reviews-Science and Engineering**, v. 44, p. 499-591, 2002.

KUMAR, A.; KANWAR, S. S. Synthesis of ethyl ferulate in organic medium using celite-immobilized lipase. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 2162-2167, 2011.

KUMAR, R.; SHARMA, M.; SINGH, R.; KAUR, J. Characterization and evolution of a metagenome-derived lipase towards enhanced enzyme activity and thermostability. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 373, p. 149-159, 2013.

LAANE, C.; BOEREN, S.; VOS, K.; VEEGER, C. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v.30, p. 81-87, 1987.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEE, K. T.; AKOH, C.C. Characterization of enzymatically synthesized structured lipids containing eicosapentaenoic, docosahexaenoic e caprylic acids. **Journal of the American Oil Chemists Society**. v. 75, n.4, p. 495-499, 1998.

LEE, M. Y.; DORDICK, J. S. Enzyme activation for nonaqueous media. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n.4, p. 376-384, 2002.

LI, W.; CHEN, B.; TAN, T. Esterification Synthesis of Ethyl Oleate in Solvent-Free System Catalyzed by Lipase Membrane from Fermentation Broth. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 163, p.102-111, 2011.

LIESE, A.; HILTERHAUS, L. Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications. **Chemical Society Reviews**, v.42, p. 6236-6249, 2013.

LOWRY, R.R.; TINSLEY, J.I. Rapid colorimetric determination of free acids. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v. 53, p. 470-472, 1976.

MADALOZZO, A. D. **Síntese de ésteres etílicos utilizando uma lipase recombinante de *Rhizopus oryzae***. 149 f. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica) - Departamento de Ciências-Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

MADALOZZO, A.D.; MUNIZ, L.S.; BARON, A.M.; PIOVAN, L.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. Characterization of an immobilized recombinant lipase from *Rhizopus oryzae*: synthesis of ethyl-oleate. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, p. 13-19, 2014.

MAHAPATRA, P.; KUMARI, A.; KUMAR G. V.; BANERJEE, R.; NAG, A. Enzymatic synthesis of fruit flavor esters by immobilized lipase from *Rhizopus oligosporus* optimized with response surface methodology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. p. 6057-63, 2009.

MALCATA, F.X.; REYES, H.R.; GARCIA, H.S.; HILL, C.G.; AMUNDSON, C.H. Immobilized Lipase Reactors for Modification of Fats and Oils-A Review. **JAACS**, v. 67, p. 890-910, 1990.

MARTÍNEZ-RUIZ, A.; GARCÍA, H.S.; SAUCEDO-CASTAÑEDA, G.; FAVELATORRES, E. Organic Phase Synthesis of Ethyl Oleate Using Lipases Produced by Solid-state Fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 151, p. 393-401, 2008.

MARTINI, V. P. **Caracterização molecular e bioquímica de novas lipases obtidas por prospecção metagenômica com aplicação em biocatálise**. 147 f. Tese (Doutorado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

MARTINI, V.P.; GLOGAUER, A.; MÜLLER-SANTOS, M.; IULEK, J.; SOUZA, E.M.; MITCHELL, D.A.; PEDROSA, F.O.; KRIEGER, N. First co-expression of a lipase and its specific foldase obtained by metagenomics. **Microbial Cell Factories**, v. 13, p. 171, 2014.

MARTINS, A. B.; GRAEBIN, N.G.; LORENZONI, A.S.G.; ROBERTO FERNANDEZ-LAFUENTE, AYUB, M.A.Z.; RODRIGUES, R.C. Rapid and high yields of synthesis of butyl acetate catalyzed by Novozym 435: Reaction optimization by response surface methodology. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 2311-2316, 2011.

MARTINS, A.B.; SILVA, A.M.; SCHEIN, M.F.; GARCIA-GALAN, C.; AYUB, M.A.Z.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R.C. Comparison of the performance of commercial immobilized lipases in the synthesis of different flavor esters. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 105, p. 18-25, 2014.

MATEO, C.; ABIAN, O.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUIBAN, J.M. Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 509-515, 2000.

MATEO, C.; ABIAN, O.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; PEDROCHE, J.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUIBAN, J. M.; TAM, A.; DAMINATI, A. Epoxy Sepabeads: A novel Epoxy Support for stabilization of industrial enzymes via very intense multipoint covalent attachment. **Biotechnology Progress**, v. 18, p. 629-634, 2002.

MATEO, C.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; CORTÉS, E.; GARCIA, J.L.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUIBÁN, J.M. One-Step Purification, Covalent Immobilization, and Additional Stabilization of Poly-His-Tagged Proteins Using Novel Heterofunctional Chelate-Epoxy Supports. **Biotechnology and Bioengineering**, v.76, p. 269-276, 2001.

MATEO, C.; GRAZÚ, V.; PALOMO, J.M.; LOPEZ-GALLEGO, F.; FERNANDEZ-LAFUENTE; GUIBÁN, J.M. Immobilization of enzymes on heterofunctional epoxy supports. **Nature Protocols**, v. 2, p. 1022-1033, 2007a.

MATEO, C.; PALOMO, J.M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUIBAN, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1451-63, 2007b.

MATEO, C.; TORRES, R.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; ORTIZ, C.; FUENTES, M.; HIDALGO, A.; LÓPEZ-GALLEGO, F.; ABIAN, O.; PALOMO, J.M.; BETANCOR, L.; PESSELA, B.C.C.; GUISAN, J.M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Epoxy-Amino Groups: A New Tool for Improved Immobilization of Proteins by the Epoxy Method. **Biomacromolecules**, v. 4, p. 772-777, 2003.

MEILLEUR, C.; HUPE, J.; JUTEAU, P.; SHARECK, F. Isolation and characterization of a new alkali-thermostable lipase cloned from a metagenomic library. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 853-861, 2009.

MENDES, A.A.; CASTRO, H.F.; GIORDANO, R.L.C. Covalent attachment of lipases on glyoxyl-agarose beads: Application in fruit flavor and biodiesel synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 70, p. 78-85, 2014.

MENG, X.; XU, G.; ZHOU, Q.L.; WU, J.P.; YANG, L.P. Highly efficient solvent-free synthesis of 1,3-diacylglycerols by lipase immobilised on nano-sized magnetite particles. **Food Chemistry**, v.143, p. 319-24, 2014.

MENG, Y.; WANG, G.; YANG, N.; ZHOU, Z.; LI, Y.; LIANG, X.; CHEN, J.; LI, Y.; LI, J. Two-step synthesis of fatty acid ethyl ester from soybean oil catalyzed by *Yarrowia lipolytica* lipase. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, p. 6, 2011.

MIRANDA, J.S.; SILVA, N.C.A.; BASSI, J.J.; CORRADINI, M.C.C.; FLÁVIA A.P. LAGE, F.A.P.; HIRATA, D.B.; MENDES, A.A. Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase on mesoporous poly-hydroxybutyrate particles and application in alkyl esters synthesis: Isotherm, thermodynamic and mass transfer studies. **Chemical Engineering Journal**, v. 251, p. 392-403, 2014.

MONTERO, S.; BLANCO, A.; VIRTO, M.D.; L. LANDETA, C.; AGUD, I.; SOLOZABAL, R.; LASCARAY, J.M.; RENOBALLES, M.; LLAMA, M.J.; SERRA, J.L. Immobilization of *Candida rugosa* lipase and some properties of the immobilized enzyme. **Enzyme Microbiology and Technology**, v.15, p. 239-247, 1993.

MORENO, J.M.; SINISTERRA, J.V. Immobilization of lipase from *Candida cylindracea* on inorganic supports. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 93, p. 357-369, 1995.

MU, H.; PORSGAARD, T. The metabolism of structured triacylglycerols. **Progress in Lipid Research**, v. 44, p. 430-448, 2005.

MURTY, V. R.; BHAT, J.; MUNISWARAM, P. K. A. Hydrolysis of Oils by Using Immobilized Lipase Enzyme: A Review. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 7, p. 57-66, 2002.

NINI, L.; SARDA, L.; COMEAU, L.C.; BOITARD, E.; DUBÉS, J.P.; CHAHINIAN, H. Lipase-catalysed hydrolysis of short-chain substrates in solution and in emulsion: a kinetic study. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1534, p.34-44, 2001.

NOGALES, J.M.R.; ROURA, E.; CONTRERAS, E. Biosynthesis of ethyl butyrate using immobilized lipase: a statistical approach. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 63-8, 2005.

NOUREDDINI, H.; GAO, X.; PHILKANA, R.S. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. **Bioresource Technology**, v. 96, p.769-777, 2005.

NUNES, P.A.; PIRES-CABRAL, P.; GUILLÉN, M.; VALERO, F.; FERREIRA-DIAS, S. Optimized Production of MLM Triacylglycerols Catalyzed by Immobilized Heterologous *Rhizopus oryzae* Lipase. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 89, p. 1287-1295, 2012.

NUNES, P.A.; PIRES-CABRAL, P.; GUILLÉN, M.; VALERO, F.; LUNA, D.; FERREIRA-DIAS, S. Production of MLM-Type Structured Lipids Catalyzed by Immobilized Heterologous *Rhizopus oryzae* Lipase. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 88, p. 473-480, 2011.

OGINO, H. Organic solvent-stable enzymes. In: Siddiqui, K.S., Thomas, T. (Eds.), Protein Adaptation in Extremophiles. Nova Science Publishers Inc., New York, 2008.

OGINO, H.; ISHIKAWA, H. Enzymes which are stable in the presence of organic solvents. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 91, p. 109-116, 2001.

OGINO, H.; YOKOO, J.; WATANABE, F.; ISHIKAWA, H. Cloning and sequencing of a gene of organic solvent-stable protease secreted from *Pseudomonas aeruginosa* PST-01 and its expression in *Escherichia coli*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 5, p. 191-200, 2000.

OH, J.; LEE, K.; PARK, H.; KIM, J.; KWON, K.; KIM, J.; KIM, H.; KIM, I. Lipase-Catalyzed Acidolysis of Olive Oil with Capric Acid: Effect of Water Activity on Incorporation and Acyl Migration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, 9280-9283, 2009.

ORREGO, C.E.; VALENCIA, J.S.; ZAPATA, C. *Candida rugosa* Lipase Supported on High Crystallinity Chitosan as Biocatalyst for the Synthesis of 1-Butyl Oleate. **Catalysis Letter**, v. 129, p. 312-322, 2009.

OSBORN, H.T.; AKOH, C. C. Structured lipids-novel fat with medical, nutraceutical and food applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 3, p. 93-103, 2002.

OTA, Y.; SAWAMOTO, T.; HASUO, M. Tributyrin Specifically Induces a Lipase with a Preference for the *sn*-2 Position of Triglyceride in *Geotrichum* sp. FO401B. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 64, p. 2497-2499, 2000.

PALUDO, N.; ALVES, J.S.; ALTMANN, C.; AYUB, M.A.Z.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R.C. The combined use of ultrasound and molecular sieves improves the synthesis of ethyl butyrate catalyzed by immobilized *Thermomyces lanuginosus* lipase. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 22, p. 89-94, 2015.

PARK, H. J.; CHOI, W. J.; HUH, E. C.; LEE, E. Y.; CHOI, Y.C. Production of Optically Active Ketoprofen by Direct Enzymatic Esterification. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 87, p. 545-547, 1999.

PENCREACH, G.; BARATTI, J. Hydrolysis of p-nitrophenyl palmitate in *n*-heptano by the *Pseudomonas cepacia* lipase: a simple test for the determination of lipase activity in organic media. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, p.417-422, 1996.

PENCREACH, G.; LEULLIER, M.; BARATTI, J.C. Properties of Free and Immobilized Lipase From *Pseudomonas cepacia*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 56, p. 181-189, 1997.

PENG, R.; LIN, J.; WEI, D. Co-Expression of an Organic Solvent-Tolerant Lipase and its Cognate Foldase of *Pseudomonas aeruginosa* CS-2 and the Application of the Immobilized Recombinant Lipase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 165, p. 926-937, 2011.

PENG, Q.; WANG, X.; SHANG, M.; HUANG, J.; GUAN, G.; LI, Y.; SHI, B. Isolation of a novel alkaline-stable lipase from a metagenomic library and its specific application for milkfat flavor production. **Microbial Cell Factories**, v. 13, p. 1-9, 2014.

QIAGEN. The QIAexpressionist A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins, QIAGEN GmbH, Hilden, Germany (1997).

QIN, H.; YAN, X.; YUN, T.; DONG, W. Biodiesel production catalyzed by whole-cell lipase from *Rhizopus chinensis*. **Chinese Journal of Catalysis**, v. 29, 41-46, 2008.

PERSSON, M.; MLADENOSKA, I.; WEHTJE, E.; ADLERCREUTZ, P. Preparation of lipases for use in organic solvents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 833-841, 2002.

RAHMAN, M.B.A.; TAJUDIN, S.M.; HUSSEIN, M.Z.; RAHMAN, R.N.Z.R.A.; SALLEH, A.B.M.B. Application of natural kaolin as support for the immobilization of lipase from *Candida rugosa* as biocatalyst for effective esterification. **Applied Clay Science**, v.29, p.111-116, 2005.

RAITA, M.; LAOTHANACHAREON, T.; CHAMPREDA, V.; LAOSIRIPOJANA, N. Biocatalytic esterification of palm oil fatty acids for biodiesel production using glycine-based cross-linked protein coated microcrystalline lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 73, 74-79, 2011.

RASERA, K. **Utilização de Sólido Fermentado obtido a partir de Fungos do Gênero Rhizopus como Catalisador para Modificação de Óleos e Gorduras**. 169. f. Tese (Doutorado em Ciências-Bioquímica) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

RASERA, K.; OSORIO, N. M.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; FERREIRA-DIAS, S. Interesterification of fat blends using a fermented solid with lipolytic activity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 76, p. 75-81, 2012.

REDA, S.Y.; CARNEIRO, P.B. Óleos e Gorduras: Aplicações e Implicações. **Revista Analytica**, v. 27, p. 60-67, 2007.

REES, H.; GRANT, S.; JONES, B.; GRANT, W.; HEAPHY, S. Detecting cellulose and esterase enzyme activities encoded by novel genes present in environmental DNA libraries. **Extremophiles**, v.7, p. 415-421, 2003.

RENZI, F.; PANETTA, G.; VALLONE, B.; BRUNORI, M.; ARCECI, M.; BOZZONI, I.; LANEVE, P.; CAFFARELLI, E. Large-scale purification and crystallization of the endoribonuclease XendoU: troubleshooting with His-tagged proteins. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 62, p. 298-301, 2006.

RESHMA, M. V.; SARITHA, S.S.; BALACHANDRAN, C.; ARUMUGHAN, C. Lipase catalyzed interesterification of palm stearin and rice bran oil blends for preparation of zero trans shortening with bioactive phytochemicals. **Bioresource Technology**, v. 99 p. 5011-5019, 2008.

RESLOW, M.; ADLERCREUTZ, P.; MATTIASSON, B. On the importance of the support material for bioorganic synthesis - influence of water partition between solvent, enzyme and solid support in water-poor reaction media. **European Journal of Biochemistry**, v.172, p.573-578, 1988.

ROH, C.; SCHMID, R.D. Isolation of an Organic Solvent-Tolerant Lipolytic Enzyme from Uncultivated Microorganism. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 171, p. 1750-1758, 2013.

ROMDHANE, I.B.; ROMDHANE, Z.B.; GARGOURI, A.; BELGHITH, H. Esterification activity and stability of *Talaromyces thermophilus* lipase immobilized onto chitosan. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, 230-239, 2010.

RÚA, L.; DÍAZ-MAURIÑO, T.; FERNÁNDEZ, V.M; OTERO, C.; BALLESTEROS, A. Purification and characterization of two distinct lipases from *Candida cylindracea*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v, 685, 1156:181-189, 1993.

RÜKOLD, S.; GROBECKER, K. H.; ISENGARD, H. D. The effects of drying on biological matrices and the consequences for reference materials. **Food Control**, v. 12, p. 401-407, 2001.

SABBANI, S.; HEDENSTRÖM, E.; NORDIN, O. The enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase is influenced by the particle size of the immobilising support material Accurel. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 42, p. 1-9, 2006.

SABUQUILLO, P.; REINA, J.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISÁN, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Interfacial affinity chromatography of lipases: separation of different fractions by selective adsorption on supports activated with hydrophobic groups. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1388, p. 337-348, 1998.

SALIS, A.; PINNA, M.; MONDUZZI, M.; SOLINAS, V. Comparison among immobilised

lipases on macroporous polypropylene toward biodiesel synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 54, p.19-26, 2008.

SALIS, A. SANJUST, E.; SOLINAS, V.; MONDUZZI, M. Characterisation of Accurel MP 1004 polypropylene powder and its use as a support for lipase immobilisation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 24, p. 75-82, 2003.

SALUM, T.F.C.; BARON, A.M.; ZAGO, E.; TURRA, V.; BARATTI, J.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. An efficient system for catalyzing ester synthesis using a lipase from a newly isolated *Burkholderia cepacia* strain. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 26, p.197-203, 2008.

SALUM, T. F. C.; VILLENEUVE, P.; BAREA, B.; YAMAMOTO, C. I.; COCCO, L. C.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Synthesis of biodiesel in column fixed-bed bioreactor using the fermented solid produced by *Burkholderia cepacia* LTEB11. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1348-1354, 2010.

SAXENA, R.K.; SHEORAN, A.; GIRI, B.; SHEBA, W.D. Purification strategies for microbial lipases. **Journal of Microbiology Methods**, v. 52, p. 1-18, 2003.

SCHUCHARDT, U.; SERCHELI, R.; VARGAS, R. M. Transesterification of vegetable oils: a review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 9, p. 199-210, 1998.

SELMİ, B.; GONTIER, E.; ERGAN, F.; THOMAS, D. Enzymatic synthesis of tricaprylin in a solvent-free system: Lipase regioespecificity as controlled by glycerol adsorption on silica gel. **Biotechnology Techniques**, v. 11, p. 543-47, 1997.

SELVIN, J.; KENNEDY, J.; LEJON, D.P.H.; KIRAN, G.S.; DOBSON, A.D.W. Isolation identification and biochemical characterization of a novel halo-tolerant lipase from the metagenome of the marine sponge *Haliclona simulans*. **Microbial Cell Factories**, v. 11, p. 1-14, 2012.

SERDAKOWSKI, A.L.; DORDICK, J.S. Enzyme activation for organic solvents made easy. **Trends in Biotechnology**, v. 26, p. 48-54, 2007.

SERRA, S.; FUGANTI, C.; BRENNA, E. Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances. **Trends in Biotechnology**, v. 23, p.193-8, 2005.

SÉVERAC, E.; GALY, O.; TURON, F.; PANTEL, C.A.; CONDORET, J-S.; MONSAN, P.; MARTY, A. Selection of CalB immobilization method to be used in continuous oil transesterification: Analysis of the economical impact. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, p. 61-70, 2011.

SHARMA, D.; SHARMA, B.; SHUKLA, A.K. Biotechnological approach of microbial lipase: A review. **Biotechnology**, v. 10, p. 23-40, 2011.

SHIMADA, Y.; WATANABE, Y.; SAMUKAWA, T.; SUGIHARA, A.; NODA, H.; FUKUDA, H.; TOMINAGA, Y. Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 76, p. 789-793, 1999.

SHIMADA, Y.; WATANABE, Y.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.17, p.133-142, 2002.

SMITH, R.E.; FINLEY, J.W.; LEVEILLE, G.A. Overview of SALATRIM, a family of low-calorie fats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 432-434, 1994.

SMITH, P. K.; R. I. KROHN; G. T. HERMANSON; A. K. MALLIA; F. H. GARTNER; M. D. PROVENZANO; E. K. FUJIMOTO; N. M. GOEKE; B. J. OLSON; D. C. KLENK. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, p. 76-85, 1985.

SOARES, C. M.; CASTRO, H. F.; MORAES, F., F.; ZANIN, G., M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore sílica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p. 745-57, v. 77-9, 1999.

SOARES, D.; PINTO, A.F.; GONÇALVES, A.G. MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. Biodiesel production from soybean soapstock acid oil by hydrolysis in subcritical water followed by lipase-catalyzed esterification using a fermented solid in a packed-bed reactor. **Biochemical Engineering Journal**, v.81, p.15-23, 2013.

SONG, J.K.; RHEE, J.S. Enhancement of stability and activity of phospholipase A1 in organic solvents by directed evolution. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1547, p. 370-378, 2001.

STAMATIS, H.; XENAKIS, A.; BORNSCHEUER, U.; SCHEPER, T.; MENGE, U.; KOLISIS, F.N. *Pseudomonas cepacia* Lipase: Esterification Reactions In Aot Microemulsion Systems. **Biotechnology Letters**, v.15, p.703-708, 1993.

STUER, W.; JAEGER, K.E.; WINKLER, U.K. Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aureginosa*. **The Journal of Bacteriology**, v.168, p.1070-1074, 1986.

SUGIHARA, A.; UESHIMA, M.; SHIMADA, Y.; TSUNASAWA, S.; TOMINAGA, Y. Purification and characterization of a novel thermostable lipase from pseudomonas-cepacia. **Journal of Biochemistry**, v. 112, p. 598-603, 1992.

SUN, J.; YU, B.; CURRAN, P.; LIU, S. Lipase-catalysed transesterification of coconut oil with fusel alcohols in a solvent-free system. **Food Chemistry**, v. 134, p. 89-94, 2012.

SUN, T.; DU, W.; LIU, D.; DAI, L. Improved catalytic performance of GA cross-linking treated *Rhizopus oryzae* IFO 4697 whole cell for biodiesel production. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1192-1195, 2010.

TALUKDER, M.M.R.; WU, J.C.; FEN, N.M.; MELISSA, Y.L.S. Two-step lipase catalysis for production of biodiesel. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, p. 207-212, 2010.

TAN, T.; LU, J.; NIE, K. DENG, L.; WANG, F. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 628-34, 2010.

THOMAS, A.; ALLOUCHE, M.; BASYN, F.; BRASSEUR, R.; KERFELEC, B. Role of the Lid Hydrophobicity Pattern in pancreatic Lipase Activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 40074-40083, 2005.

TIRAWONGSAROJ, P.; SRIPRANG, R.; HARNPICHARNCHAI, P.; THONGARAM, T.; CHAMPREDA, V.; TANAPONGPIPAT, S.; POOTANAKIT, K.; EURWILAICHITR, L. Novel thermophilic and thermostable lipolytic enzymes from a Thailand hot spring metagenomic library. **The Journal of Bacteriology**, v. 133, p. 42-49, 2008.

TISS, A.; CARRIERE, F.; VERGER, R. Effects of gum arabic on lipase interfacial binding and activity. **Analytical Biochemistry**, v. 294, p. 36-43, 2001.

TORSVIK, V.; SORHEIM, R.; GOKSOYR, J. Total bacterial diversity in soil and sediment communities a review. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 17, p. 170-178, 1996.

TRAMPER, J. **Applied biocatalysis: From product request to idea to product**. In: Applied Biocatalysis. Netherlands: Ed. Harwood academic publishers, 1994.

TRUBIANO, G.; BORIO, D.; ERRAZU, A. Influence of the operating conditions and the external mass transfer limitations on the synthesis of fatty acid esters using a *Candida antarctica* lipase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 716-722, 2007.

VAN, J. G. Biodiesel processing and production. **Fuel Processing Technology**, v.86, p.1097-1107, 2005.

VIEILLE, C.; ZEIKUS, G. J. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, p. 1-43, 2001.

VILLENEUVE, P.; MUDERRHWA, J.M.; GRAILLE, J.; HAAS, M.J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.9, p. 113-148, 2000.

VINU, A.; MIYAHARA, M.; ARIGA, K. Biomaterial immobilization in nanoporous carbon molecular sieves: influence of solution pH, pore volume, and pore diameter. **The Journal of Physical Chemistry B**, v.109, p. 6436-41, 2005.

WISDOM, R.A.; DUNNILL, P.; LILLY, M.D. Enzymic interesterification of fats: factors influencing the choice of support for immobilized lipase. **Enzyme Microbiology and Biotechnology**, v. 6, p. 443-446, 1984.

XU, X. Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: a review. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 102, p. 287-303, 2000.

YADAV, G.D.; DEVENDRAN, S. Lipase catalyzed synthesis of cinnamyl acetate via transesterification in non-aqueous médium. **Process Biochemistry**, v.47, p. 496-502, 2012.

YADAV, G. D.; DEVI, K. M. Immobilized lipase-catalysed esterification and transesterification reactions in non-aqueous media for the synthesis of tetrahydrofurfuryl butyrate: comparison and kinetic modeling. **Chemical Engineering Science**, v. 59, p. 373-383, 2004.

YADAV, G.D.; JADHAV, S.R. Synthesis of reusable lipases by immobilization on hexagonal mesoporous silica and encapsulation in calcium alginate: Transterification in non-aqueous medium. **Microsporous and Mesoporous Materials**, v. 86, p. 215-222, 2005.

YADAV, G.D.; MEHTA, P.H. Heterogeneous catalysis in esterification reactions: preparation of phenethyl acetate and cyclohexyl acetate by using a variety of solid acidic catalysts. **Industrial & Engineering Chemistry Research**. v. 33, p. 2198-208, 1994.

YANG, T.; FRUEKILDE, M-B.; XU, X. Suppression of acyl migration in enzymatic production of structured lipids through temperature programming. **Food Chemistry**, v. 92, 101-107, 2005.

YU, D.; WANG, Z.; ZHAO, L.; CHENG, Y.; CAO, S. Resolution of 2-octanol by SBA-15 immobilized *Pseudomonas* sp. Lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 48, p. 64-69, 2007.

WATANABE, T.; SHIMIZU, M.; SUGIURA, M.; SATO, M.; KOHORI, J.; YAMADA, N.; NAKANISHI, K. Optimization of Reaction Conditions for the Production of DAG Using Immobilized 1,3-Regiospecific Lipase Lipozyme RM IM. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 80, p. 1201-1207, 2003.

WILLIS, W.M.; LENCKI, R.W.; MARANGONI, A.G. Lipid modification strategies in the production of nutritionally functional fats and oils. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 38, p. 639-674, 1998.

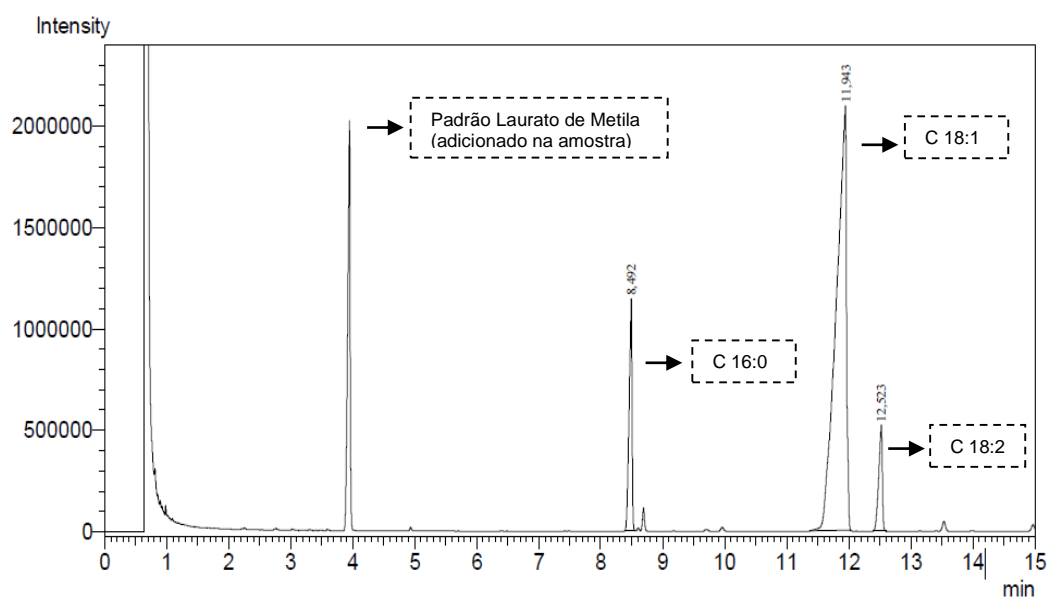
ZHENG, J.; LIU, C.; LIU, L.; JIN, Q. Characterisation of a thermo-alkali-stable lipase from oil-contaminated soil using a metagenomic approach. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 36, p. 97-204, 2013.

APÊNDICES

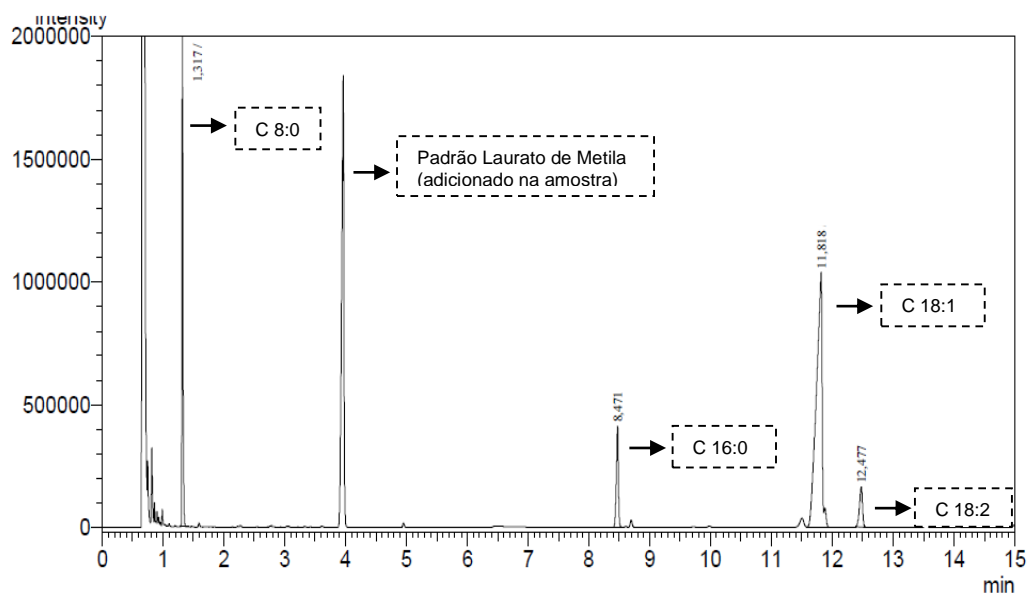
A. CROMATOGRAMAS PARA IDENTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS DO AZEITE DE OLIVA ANTES (a) E DEPOIS (b) DA REAÇÃO DE ACIDÓLISE COM ÁCIDO CAPRÍLICO

Condições da reação: 3 g de azeite de oliva, 0,98 g de ácido caprílico, 600 mg de Ibead-EBLipC12; 40 °C e 300 rpm. A identificação dos ácidos graxos foi realizada por comparação dos tempos de retenção dos picos da amostra com os picos de uma mistura padrão de metil-ésteres Mix FAME37 (Supelco®, Bellefonte, Pensilvânia, EUA) e também por comparação com os padrões de ácidos graxos etilados.

(a)

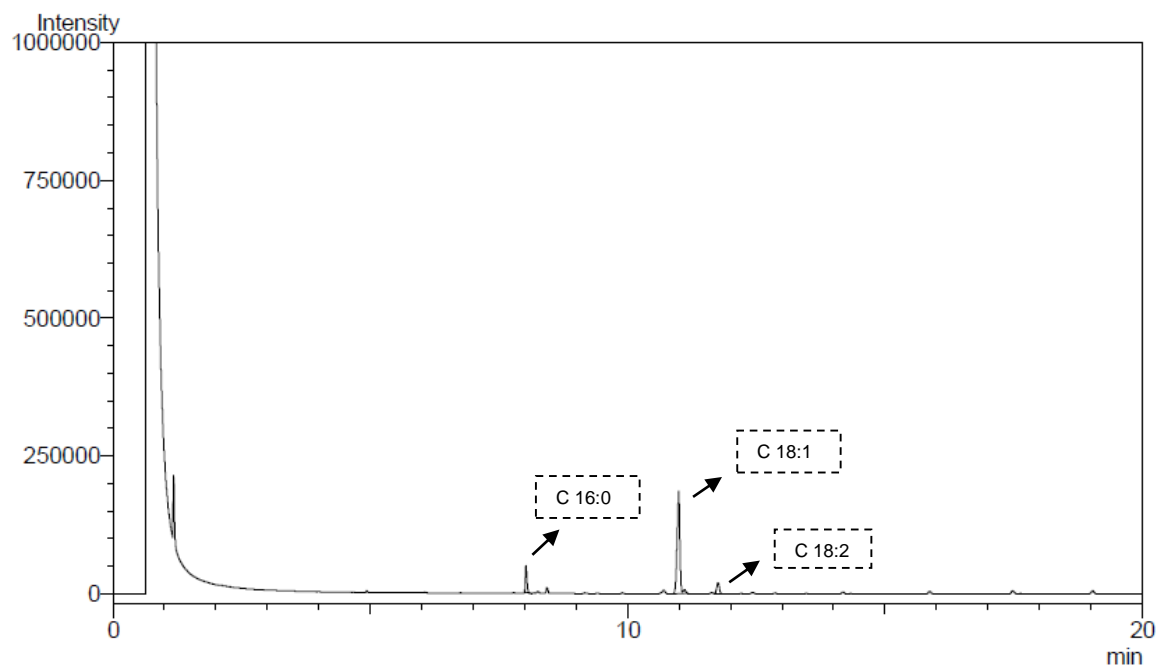


(b)



B. COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GRAXOS DOS MONOACILGLICERÓIS ISOLADOS A PARTIR DA HIDRÓLISE DO LIPÍDIO ESTRUTURADO (AZEITE DE OLIVA + ÁCIDO CAPRÍLICO)

Condições da reação de hidrólise em *n*-hexano: 5 mL de *n*-hexano, triacilglicerol estruturado, 2% de água, 20 mg de enzima imobilizada, 200 rpm, 40 °C. A identificação dos ácidos graxos foi realizada por comparação dos tempos de retenção dos picos da amostra com os picos de uma mistura padrão de metil-ésteres Mix FAME37 (Supelco®, Bellefonte, Pensilvânia, EUA) e também por comparação com os padrões de ácidos graxos etilados.



D. ARTIGO 1

MADALOZZO, A.D.; MARTINI, V.P.; KUNIYOSHI, K.K.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O.; GLOGAUER, A.; ZANIN, G.M.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. Immobilization of LipC12, a new lipase obtained by metagenomics, and its application in the synthesis of biodiesel esters. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.116, p. 45-51, 2015.